

**Identifizierung von Cytokinesemutanten in *Ustilago maydis*
und molekulare Charakterisierung des *cla4*-Gens**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Leonóra Leveleki
aus Nyíregyháza

Marburg/Lahn 2002

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von September 1999 bis November 2002 im Institut für Genetik der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Michael Bölker durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
Am 10.01.2003 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung am: 28. Januar 2003

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurde das folgende Manuskript erstellt:

Leveleki L, Mahlert M, Gül L, Piscator M, Bölker M. Cdc42 regulates cell polarity and cytokinesis in *Ustilago maydis* but is not required for viability (Manuskript in Vorbereitung)

*Sage nicht immer was Du weißt,
aber wisse immer was Du sagst*

Matthias Claudius (1740 - 1815)

I. INHALTSVERZEICHNIS

I. Inhaltsverzeichnis.....	I
II. Zusammenfassung.....	1
III. Einleitung.....	2
1. Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i>	2
2. Zellteilung in <i>Ustilago maydis</i>	5
2.1. Cdc42.....	10
2.1.1. Struktur von Cdc42.....	11
2.1.2. Effektoren von Cdc42.....	13
3. Regulation der Zellpolarität in der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3.1. Septine als Scaffolds in der Polarisierung	16
4. Zielsetzung.....	17
IV. Material und Methoden.....	18
5. Material und Bezugsquellen	18
5.1. Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	18
5.1.1. Chemikalien.....	18
5.1.2. Puffer und Lösungen	19
5.1.3. Medien	22
5.1.3.1. E.coli Medien	22
5.1.3.2. <i>Ustilago maydis</i> Medien.....	22
5.1.4. Farbstoffe.....	23
5.1.5. Verwendete Antikörper und Goldpartikel	24
5.1.6. Enzyme	24
5.1.7. Verwendete Kits und sonstiges Material	24
5.1.8. Verwendete Primer	25
5.2. Stämme	26
5.2.1. <i>E. coli</i> -Stämme	26
5.2.2. <i>U. maydis</i> -Stämme	26
5.3. Plasmide und Plasmidkonstruktionen.....	28
5.3.1. Ausgangsplasmide	29
5.3.2. In dieser Arbeit hergestellte Plasmide	29
5.3.2.1. Konstruktion einer freireplizierenden, genomischen Cosmid-Bank	32
5.3.2.2. Strategie zur Isolierung des <i>cla4</i> -Gens.....	32

6. Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	35
6.1. <i>Escherichia coli</i>	35
6.1.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	35
6.1.2. Bestimmung der Zelldichte bei <i>E. coli</i>	35
6.1.3. Elektroporations-Transformation von <i>E. coli</i>	35
6.2. <i>Ustilago maydis</i>	36
6.2.1. Kultivierung von <i>U. maydis</i>	36
6.2.2. Induktion von Stämmen	36
6.2.3. Bestimmung der Zelldichte bei <i>U. maydis</i>	36
6.2.4. Transformation von <i>U. maydis</i>	36
6.2.5. Kreuzungsversuche bzw. Test auf filamentöses Wachstum.....	37
6.2.6. Konfrontationstest	37
6.2.7. Maisvarietäten (<i>Zea mays</i> spec.)	37
6.2.8. Test auf Pathogenität	38
6.2.9. Sporulation und Segregationsanalyse.....	38
6.2.10. UV-Mutagenese.....	38
6.2.11. Mikroskopie und Bildverarbeitung.....	38
6.2.11.1. Fluoreszenz Mikroskopie	39
6.2.11.1.1. Fixierung der Zellen für Fluoreszenz Mikroskopie.....	39
6.2.11.1.2. Färbungen	39
6.2.11.1.2.1. SYTO, Calcofluor White, Wheat Germ Agglutinin (WGA)	39
6.2.11.1.2.2. FM4-64.....	39
6.2.11.1.2.3. Immunostaining.....	39
6.2.11.2. Elektronenmikroskopie.....	40
6.2.11.2.1. Fixierung der Zellen für Elektronenmikroskopie	40
6.2.11.2.2. Einbettung in Epon	40
6.2.11.2.3. Gefrierschnitte	40
6.2.11.2.4. Immunogold Labelling	40
7. Molekularbiologische Standardmethoden	41
7.1. Isolierung von Nukleinsäuren.....	41
7.1.1. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (kochende Lyse)	41
7.1.2. Maxipräparation von Cosmid- bzw. Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	41
7.1.3. Fällung von DNA	41
7.1.4. DNA-Isolierung aus <i>U. maydis</i>	42

7.1.5.	Isolierung hochmolekularer DNA aus <i>U. maydis</i>	42
7.2.	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	42
7.2.1.	DNA-Größenstandards	42
7.3.	Sequenz- und Strukturanalyse	42
7.3.1.	Sequenzierung von DNA.....	42
7.3.2.	Sequenz- und Strukturanalyse	43
7.4.	PCR-Techniken	43
7.4.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Innis <i>et al.</i> , 1990).....	43
7.4.2.	Vectorette-PCR.....	44
7.5.	Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplicons.....	47
7.6.	Extraktion und Klonierung der Amplicons	48
7.7.	<i>in vitro</i> -Modifikationen von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	48
7.7.1.	Restriktion von DNA.....	48
7.7.2.	Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente	48
7.7.3.	Ligation von DNA-Fragmenten	49
7.8.	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	49
7.8.1.	Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	49
7.8.2.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	49
7.9.	Transfer von Nukleinsäuren	50
7.9.1.	Spezifischer Nachweis von an Membranen gebundener DNA	50
7.9.2.	Herstellung von Hybridisierungssonden	50
V.	Ergebnisse	51
8.	Identifizierung weiterer Cytokinese-Mutanten	51
8.1.	Komplementationstest mit <i>don1</i> und <i>don3</i>	53
9.	Beschreibung der neuen morphologischen Mutanten.....	53
9.1.	Phänotyp der <i>don</i> -ähnlichen Mutanten.....	53
10.	Septenbildung in den Mutanten	60
11.	Die Akkumulation von Endosomen am primären Septum spielt eine Rolle in der Septierung	64
11.1.	Lokalisierung der Don1 FYVE Zn-Finger Domäne in <i>U. maydis</i>	67
12.	Septine, cytoskeletale Polymere in der Cytokinese	70
12.1.	Lokalisierung des Cdc10 Septin Homologes in <i>U. maydis</i> Wildtyp-Zellen.....	70
12.2.	In den neu isolierten Mutanten ist die Cytokinese an unterschiedlichen Punkten blockiert	75

13. Epistasis-Analyse der neuen Cytokinese-Mutanten	76
13.1. Der Phänotyp der <i>cla4</i> und <i>don5</i> Mutanten blieb nach der Induktion des konstitutiv aktiven Allel von <i>cdc42</i> erhalten	79
13.2. Der Phänotyp von <i>don6</i> Zellen kann durch die Expression des Cdc42 ^{Q61L} Proteins gerettet werden	80
13.3. Das <i>cdc42</i> Gen der <i>don6</i> Mutante weist eine stille Mutation auf.....	81
13.4. Einordnung der neuen Cytokinese-Mutanten in die Cdc42 Kaskade.....	83
13.5. EM Untersuchung von <i>don1</i> Zellen nach der Induktion von Cdc42 ^{Q61L}	83
14. Dominant negative Varianten von Cdc42 beeinflussen das polarisierte Wachstum	87
14.1. Die <i>cdc42</i> ^{V44A} Mutante zeigt einen <i>cla4</i> -ähnlichen Phänotyp.....	89
14.1.1. <i>cdc42</i> ^{V44A} Zellen zeigen abnormal delokalisierte Chitin-Ablagerung.....	90
14.1.2. <i>cdc42</i> ^{V44A} Zellen zeigen einen Mitosedefekt.....	91
15. Kreuzungstest auf Charcoal-Platten.....	92
16. Pathogenität	93
17. Komplementation der <i>don</i>-ähnlichen Mutanten mit einer Cosmidbank	95
18. Isolierung des der <i>cla4</i> Gens aus der <i>U. maydis</i> Cosmid-Bank	97
18.1. Subklonierung des <i>cla4</i> -Gens.....	97
18.2. Die Mutationsanalyse des <i>cla4</i> ⁻ Genes weist auf eine Mutation in der Kinase Domäne hin.....	102
18.3. Überexpression des Cla4 Proteins in Wildtyp-Zellen	104
19. Cla4 wird für die Regulation der Zellpolarität benötigt.....	105
19.1. <i>cla4</i> Zellen sind einfach septiert.....	106
19.2. Lokalisierung des Cla4 Proteins in haploiden und dikaryotischen Zellen	107
19.3. Die Delokalisierung von Cla4 in $\Delta cdc10$ -Mutanten weist auf eine mögliche Interaktion mit dem Septin Cdc10 hin.....	109
19.4. Cla4 reguliert die Polarität des Aktin-Cytoskeletts	111
19.4.1. Aktin-Lokalisierung in Wildtyp-Zellen.....	111
19.4.2. In <i>don1</i> Zellen wird eine normale Aktinverteilung beobachtet.....	112
19.4.3. In <i>cla4</i> Mutanten ist die Aktinverteilung gestört.....	113
19.5. <i>cla4</i> Zellen zeigen bei erhöhter Temperatur einen Defekt in der Kernverteilung	115
19.6. Cla4 ist Teil eines weiteren Cdc42 abhängigen Signalweges in <i>U. maydis</i>	115
VI. Diskussion	117
20. Identifizierung neuer Cytokinese-Mutanten.....	117

21. Zellbiologische Charakterisierung der neu isolierten Cytokinese-Mutanten.....	117
22. Epistasis-Analyse der <i>don1</i>, <i>don3</i>, <i>don5</i>, <i>don6</i> und <i>cla4</i> Mutanten zeigt ihre Stelle in der Cdc42 Signalisierungskaskade	122
23. Regulation der Zellpolarität	127
24. <i>cla4</i> kodiert einen neuen Effektoren von Cdc42 in <i>U. maydis</i>	128
24.1. Aktivierung von Ste20-ähnlichen Kinasen durch Cdc42	130
24.2. Die Rolle von Cla4 während der Cytokinese in <i>U. maydis</i>	131
24.3. Missense Mutation in der Kinase Domäne von Cla4 führt zu seiner Fehlfunktion	134
25. Cdc42-Signalisierungskaskaden in <i>U. maydis</i>	135
VII. Literaturverzeichnis.....	I

ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
Ara	Arabinose
C-terminal	carboxyterminal
Cbx	Carboxin
Cbx ^R	Carboxin Resistenz
CRIB	Cdc42/Rac Interactive Binding
DIC	"differential interference contrast"
EGFP	"enhanced green fluorescent protein"
EM	Elektronenmikroskopie
ESE	„Exonic splicing enhancer“
ESS	„Exonic splicing silencer“
GAP	"GTPase activating protein"
GDI	„guanine nucleotide dissociation inhibitor“
GEF	"guanine nucleotide exchange factor"
GFP	"green fluorescent protein"
Hyg	Hygromycin
Hyg ^R	Hygromycin Resistenz
MC	Methyl-Cellulose
N-terminal	aminoterminal
OD ₅₉₅	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	"open reading frame"
PCR	"polymerase chain reaction"
PD	"potato dextrose"
PEG	Polyethylenglycol
PH	Pleckstrin Homologie
PI	Phosphatidylinositol
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-monophosphat
PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
RT	Raumtemperatur
TAE	Tris-Acetat + Na ₂ -EDTA
TBE	Tris-Borat + Na ₂ -EDTA
TE	Tris-Cl + Na ₂ -EDTA
Tris	Trishydroxymethylamino-methan
UA	Uranyl-Acetat
UARS	" <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence"
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp

II. ZUSAMMENFASSUNG

Mittels UV-Mutagenese wurden neue Cytokinese-Mutanten in *Ustilago maydis* identifiziert, die bei der Regulation der Septierung eine Rolle spielen. Es konnten in mehreren Experimenten insgesamt 51 Mutanten isoliert werden, die nach einer Komplementationsanalyse mit den *don1* und *don3* Mutanten in 5 neue Komplementationsgruppen eingeteilt werden konnten (*don4*, *don5*, *don6*, *dol1* und *cla4*).

Mikroskopische Analysen der Mutanten zeigten, dass die *don4* und *don5* Mutanten zwei Septen bilden und in einigen Fällen die Cytokinese vollziehen können. Die *don6* Mutante akkumuliert im Gegensatz zu *don1* und *don3* keine Membranstrukturen am primären Septum und ihr Phänotyp kann nicht nur durch Cdc42^{Q61L} sondern auch durch Expression des Wildtyp Cdc42 Proteins gerettet werden, was darauf hinweist, dass diese Mutation möglicherweise mit *cdc42* allelisch ist. Weitere Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die *don6* Mutante zwar im *cdc42* Gen eine Punktmutation enthielt, die jedoch zu keiner Änderung in der abgeleiteten Proteinsequenz führte.

Färbungen der Zellen der *cla4* Mutante zeigten, dass die Chitin-Ablagerung in der Zellwand gestört ist. Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen wiesen darauf hin, dass *cla4*-Zellen septiert sind. Diese Septum ähnelt jedoch nicht dem bei der normalen Knospung. Die *cla4* Zellmorphologie ähnelt der von Wildtyp-Zellen, die eine dominant negative Variante des Cdc42 Proteins (Cdc42^{T17N}) exprimieren. Die Klonierung und Sequenzierung des *cla4*-Gens ergab, dass das Cla4 Protein in die Familie der Ste20-ähnlichen Proteinkinasen gehört, die von Cdc42 aktiviert werden. Die Immunfärbung von Aktin in der *cla4* Mutante zeigt eine Störung in der Polarisierung des Aktin-Cytoskeletts. Ein Cla4-GFP Fusionsprotein lokalisiert an der Stelle der Knospenbildung, an der Spitze wachsender Knospen und an den Orten der Septumbildung. Dies unterstützt die Annahme, dass das Protein am polarisierten Wachstum und der Cytokinese beteiligt ist. Weder Cla4 noch Don1/Don3 werden für die Zellfusion bei der Kreuzungsreaktion und auch nicht für die Pathogenität benötigt.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Cdc42 in *U. maydis* in mindestens zwei unabhängigen Signalwegen eine Rolle spielt: Die Bildung des sekundären Septums während der Cytokinese wird über die Don1/Cdc42/Don3 Signalkaskade reguliert, weiterhin wird das polarisierte Wachstum über die Aktivierung von Cla4 durch Cdc42 gesteuert.

III. EINLEITUNG

1. Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Die Evolution der Pilze hängt weitgehend von der Weiterentwicklung und Ausbreitung grüner Pflanzen ab. Die Mehrzahl der Pilzarten lebt saprophytisch, einige wenige parasitisch. Diese sind, zumindest in bestimmten Phasen ihres Lebenszyklus, auf ein Wirkstoffangebot (z.B. ein Angebot an Vitaminen) angewiesen, wie es in dieser Form nur von lebenden Zellen bereitgestellt werden kann. Es ist auffallend, dass Pflanzenkrankheiten in der Natur relativ selten sind. Die Ursachen dafür sind wirkungsvolle Abwehrmechanismen, die einer Ausbreitung parasitärer Pilze entgegenstehen. Ferner ist bemerkenswert, dass pflanzliche Parasiten (das gilt gleichermaßen für Pilze, Bakterien und Viren) meist streng wirtsspezifisch sind. Einige von ihnen sind sogar auf einen Wirtswechsel angewiesen, durch den sich das eine Entwicklungsstadium des Parasiten in einem, das darauffolgende in einem anderen (mit dem ersten phylogenetisch nicht nah verwandten) abspielt. Wegen der hohen Wirtsspezifität können Parasiten in Monokulturen (Landwirtschaft) weit mehr Schäden anrichten als in artenreichen Pflanzengesellschaften. Der jährliche Verlust an Nahrungsmitteln entspricht einer Menge, die zur Versorgung von 300 Millionen Menschen ausreichen würde.

Die Basidiomyceten enthalten zwei wichtige Ordnungen parasitärer Pilze: Uredinales (Rostpilze) und Ustilaginales (Brandpilze). Die Uredinales (ca. 4000 Arten in 100 Gattungen) zeichnen sich durch eine rötlich-braune Färbung (Rost) ihrer Sporen aus. Sie bilden Haustorien, und sie befallen eine Vielzahl von Angiospermen, Gymnospermen und Pteridophyten. *Puccinia graminis* ist das klassische Beispiel für einen Pilz mit Wirtswechsel. Haploides (monokaryotisches) Mycel wächst auf *Berberis* (Berberitze), dikaryotisches auf verschiedenen Gräsern (Esser, 1976).

Die Ustilaginales sind Parasiten mit über 1200 Arten in mehr als 50 verschiedenen Gattungen (Vánky, 1987) auf Wirten aus über 75 Angiospermenfamilien. Sie produzieren dunkle, pulverartige Sporen auf Blättern, Sprossen, Blüten und Früchten. Zu dieser Ordnung gehört *Ustilago maydis*, der Verursacher des Maisbrandes (Christensen, 1963; Esser, 1976).

Neben den saprophytisch wachsenden, haploiden Sporidien bildet *Ustilago maydis* nach der Fusion zweier kompatibler Zellen ein filamentöses Dikaryon, das gleichzeitig die pathogene Form von *U. maydis* darstellt. Kompatible Sporidien beinhalten jeweils unterschiedliche Allele der beiden Paarungstyploci *a* und *b*, welche eine genetische Voraussetzung für die

Zell/Zell-Erkennung und die erfolgreiche Infektion des Wirts darstellen (Banuett, 1995; Kahmann *et al.*, 2000).

In der Natur findet sowohl die gegenseitige Erkennung der kompatiblen Sporidien wie auch die Zellfusion auf der Blattoberfläche der Wirtspflanzen Mais (*Zea mays*) oder Teosinte (*Zea mexicana*) statt (Christensen, 1963; Holliday, 1961). Nach der gegenseitigen Erkennung der Kreuzungspartner werden Konjugationshyphen gebildet, die aufeinander zuwachsen (**Abbildung 1**) (Snetselaar *et al.*, 1996). Mit der Fusion dieser Hyphen bilden sich die infektiösen, dikaryotischen Filamente (Snetselaar and Mims, 1992, 1993). Außerhalb der Pflanze besteht das dikaryotische Filament aus einer wachsenden Spitzenzelle und durch regelmäßige Septen abgetrennte leere Abschnitte der vorhergehenden Wachstumszonen (Christensen, 1963). Sowohl die Zell/Zell-Erkennung als auch die Bildung des filamentösen Dikaryons kann im Labor auf aktivkohlehaltigem Medium nachvollzogen werden (Banuett and Herskowitz, 1994; Day and Anagnostakis, 1971), wobei die leeren, septierten Filamente der dikaryotischen Hyphen weißlich erscheinen.

Für die pathogene Entwicklung und damit auch für die Ausbildung der sexuellen Sporen ist der Pilz strikt an seine Wirtspflanze gebunden. Das infektiöse Dikaryon dringt nach der Ausbildung einer appressorienartigen Struktur in die Pflanze ein (**Abbildung 1**) (Snetselaar and Mims, 1992, 1993). Nach einigen Tagen kann neben Nekrosen an den ursprünglichen Infektionsstellen eine Anthocyanbildung in den Pflanzenzellen beobachtet werden (Banuett and Herskowitz, 1996; Snetselaar and Mims, 1993) und fünf bis sechs Tage nach der Infektion sind die erste kleine Tumore erkennbar (Banuett and Herskowitz, 1996). In den sich vergrößernden Tumoren kommt es in den folgenden Tagen zu einer starken Proliferation der verzweigten Hyphen. Ungefähr neun bis zehn Tage nach Inokulation erscheinen die Hyphen als „wurmartig“ umeinander gewundene, in eine gallertartige Masse eingebettete Strukturen (Banuett and Herskowitz, 1996), anschließend zerfallen diese sporogenen Hyphen in Segmente. Eine Kernfärbung intakter oder fragmentierter Hyphen zeigte einen Nukleus pro Zelle, was vermuten läßt, dass die Karyogamie in diesem Stadium bereits stattgefunden hatte (Banuett and Herskowitz, 1996). Zehn bis elf Tage nach der Infektion tritt ein morphologischer Wandel von zylindrisch geformten Hyphenfragmenten hin zu riesigen Mengen sich abrundender Zellen ein (Banuett and Herskowitz, 1996; Snetselaar and Mims, 1993) und die Zellen dieses Präsporulationsstadiums besitzen einen Nukleus und variieren stark in ihrer Morphologie (Banuett and Herskowitz, 1996). Am 13. bis 14.Tag nach der Infektion sind die Gallen mit abgerundeten Zellen angefüllt, die sich in verschiedenen Stadien der Sporenwandreifung befinden. Unreife Teliosporen sind gelblich-braun gefärbt und

lichtmikroskopisch leicht von der reifen Form zu unterscheiden, die neben der dunkelbraunen Pigmentierung eine charakteristische ornamentierte Oberflächenstruktur aufweisen (Banuett and Herskowitz, 1996; Christensen, 1963). Reife Pflanzengallen sind mit Millionen braunschwarzer Brandsporen angefüllt. Die reifen, trockenen Tumore platzen auf, wodurch die diploiden Sporen entlassen werden (Christensen, 1963), die vermutlich den Hauptverbreitungsweg des Pilzes in der Natur darstellen.

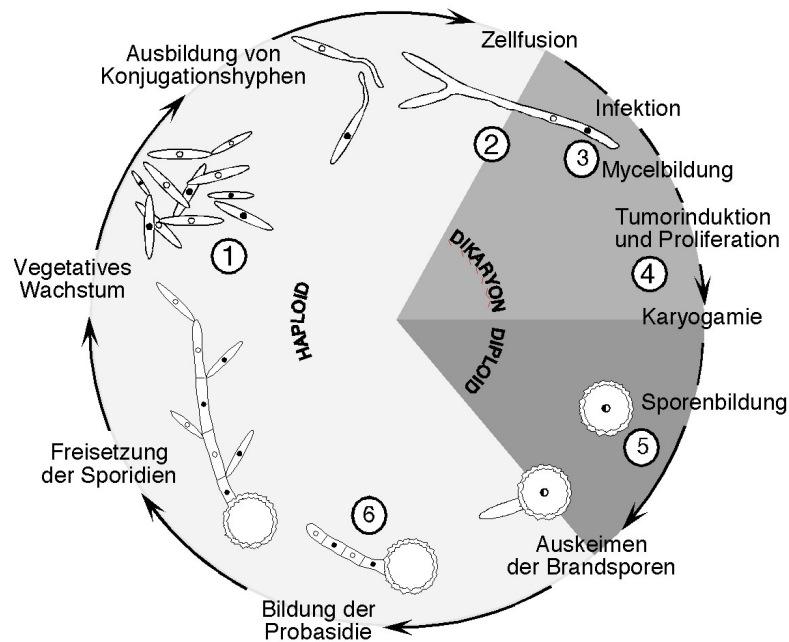


Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *U. maydis* (Brachmann, 2001). Schematische Darstellung des Lebenszyklus. Nach der gegenseitigen Erkennung der Kreuzungspartner werden Konjugationshyphen gebildet, die aufeinander zuwachsen (1) und die infektiösen, dikaryotischen Filamente bilden (2). Das infektiöse Dikaryon dringt nach der Ausbildung einer appressorienartigen Struktur in die Pflanze ein (3). Fünf bis sechs Tage nach der Infektion sind die ersten kleinen Tumore erkennbar (4). Am 13. bis 14. Tag nach der Infektion sind die Gallen mit abgerundeten Zellen angefüllt, die sich in verschiedenen Stadien der Sporenwandreifung befinden (5). Die reifen, trockenen Tumore platzen auf, wodurch die diploiden Sporen entlassen werden und die erste meiotische Teilung beginnen kann (6).

Während der Keimung der Teliosporen wächst das Promycel auf eine Länge von bis zu 20 µm bevor das erste Septum eingezogen wird (**Abbildung 1**). Dieser Zeitpunkt überlappt mit dem Abschluss der ersten meiotischen Teilung (Ramberg and McLaughlin, 1980). Meist wird ein dreigeteiltes Promycelium ausgebildet, dessen Kompartimente in Bezug auf die Spore proximal, intermediär und distal positioniert und mit Lipidtropfen, Mitochondrien und Ribosomen angefüllt sind (O'Donnell and McLaughlin, 1984; Ramberg and McLaughlin, 1980). Jedes dieser probasidialen Kompartimente besitzt einen haploiden Nukleus.

Ausgehend von der septierten Probasidie werden die haploiden Sporidien seitlich abgeschnürt (Christensen, 1963; Ramberg and McLaughlin, 1980).

Bei der Keimung der diploiden Sporen auf der Blattoberfläche kann es nach Fusion der kompatiblen Meioseprodukte zu einer direkten Infektion der Wirtspflanze kommen (Millis and Kotze, 1981; Walther, 1934). Sowohl die Sporenkeimung als auch die damit verbundene Meiose kann auf artifiziellem Medium unabhängig von der Wirtspflanze nachvollzogen werden (Banuett, 1992, 1995). Die zigarrenförmigen Sporidien teilen sich hefeartig durch Knospung und können unter Laborbedingungen in Flüssig- oder auf Festmedium kultiviert werden (**Abbildung 1**).

Der Pilz *Ustilago maydis* eignet sich ganz besonders für genetische Untersuchungen: Ein effektives Transformationssystem ist verfügbar und durch homologe Rekombination können leicht Knockout-Mutanten erzeugt werden. *U. maydis* ist deshalb ein hervorragender Modellorganismus für die Untersuchung pilzlicher Pathogenität und Dimorphismus (Banuett, 1995).

2. Zellteilung in *Ustilago maydis*

Bei der Isolierung morphologischer Mutanten konnten solche isoliert werden, bei denen der letzte Schritt der Zellteilung, die Ablösung der Tochterzellen von der Mutterzelle, gestört ist. Diese Mutanten bilden in Flüssigkultur bäumchenartige Strukturen. Auf Festmedium zeichnen sich die gebildeten Kolonien durch eine ringförmige Morphologie aus, die an Kringel erinnert. Die betroffenen Gene wurden deshalb als *don1* bzw. *don3* bezeichnet („donut“-Phänotyp). In diesen Mutanten scheint die Polarität gestört zu sein, da die neu gebildeten Knospen an dem distalen Pol von der jeweiligen Mutterzelle erscheinen. Wildtyp-Zellen formen im Gegensatz ihre nächste Knospe an alternierenden Polen (Jacobs *et al.*, 1994; Weinzierl *et al.*, 2002).

Die Cytokinese in *U. maydis* unterscheidet sich deutlich von der in der Hefe, wo nur ein einzelnes Septum gebildet wird. Die Don1 und Don3 Proteine sind für die Bildung des sekundären Septums verantwortlich, das durch die Abgrenzung der Fragmentierungszone zwischen Mutter und Tochterzellen für die Zelltrennung benötigt wird. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass beide *don*-Mutanten nur das primäre Septum bilden und an der Tochterseite des Septums irreguläre Membranstrukturen akkumulieren (**Abbildung 2** und **Abbildung 3**) (Weinzierl *et al.*, 2002).

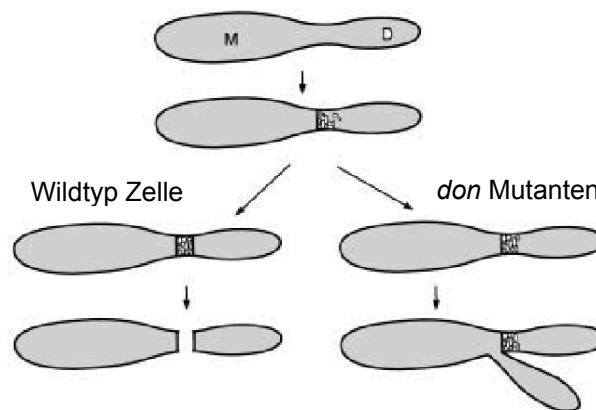


Abbildung 2: Cytokinese und Zelltrennung in *U. maydis* (Weinzierl *et al.*, 2002). Nach der Knospenbildung und Kernteilung wird das primäre Septum zwischen Mutter- und Tochterzellen gebildet. Darauf erfolgt eine Akkumulation von Membranstrukturen an der Tochterseite, wodurch die Fragmentierungszone gebildet wird. Diese Zone wird von dem sekundären Septum abgetrennt. Dieser Prozess wird durch die Don1 und Don3 Proteine reguliert und ist in den *don*-Mutanten blockiert, so dass die Tochterzellen mit ihren Mutterzellen verbunden bleiben und bäumchenartige Strukturen bilden.

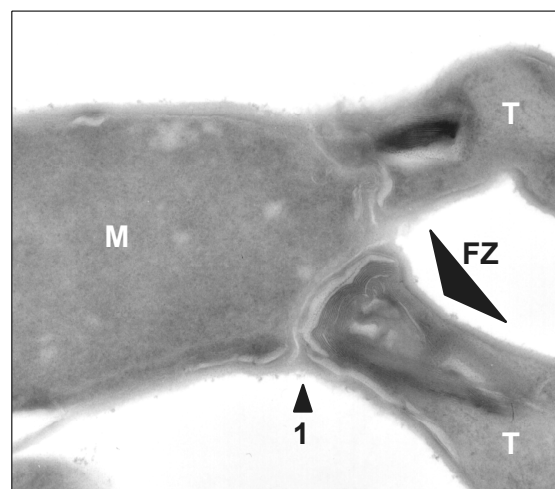


Abbildung 3: Septierungsdefekt in der *don1* Mutante in *U. maydis* (Weinzierl *et al.*, 2002). 1: primäres Septum FZ: Fragmentierungszone M: Mutterzelle T: Tochterzelle. Beide *don*-Mutanten (*don1* und *don3*) bilden nur ein primäres Septum und akkumulieren an der Tochterseite des Septums irreguläre Membranstrukturen, die die Fragmentierungszone aufbauen. Diese Mutanten bilden aber kein sekundäres Septum.

Ähnlichkeiten in der Septierung während der Meiose zu der während der Mitose wurden bereits in den 80er Jahren beschrieben (O'Donnell and McLaughlin, 1984). Im Promycel werden Septen gebildet, die 0,15-0,2 μm dick sind und eine mehrschichtige Struktur zeigen: Zwei etwa 50-75 nm dicke elektronendichte Schichten, die dunkel erscheinen, sind von einer etwa 10-14 nm dicken elektronendurchlässigen zentralen Lamella separiert. Multivesikuläre

Körper und Mikrovesikel sind entlang des zentripetal wachsenden Septums zu sehen. Häufig wird ein zusätzliches, dünnes, unregelmäßiges Septum im Abstand von 0,5-1,4 µm von einem der promycelialen Septen gebildet, in den meisten Fällen handelt es sich dabei um das mittlere der drei Septen des Promycels. Eine sehr ähnliche Septumbildung findet auch bei der ersten postmeiotischen Mitose zwischen dem Promycelium und der Basidiospore statt. Dabei wird ebenfalls eine Fragmentierungszone von einem primären und sekundären Septum begrenzt und bewirkt die Abschnürung der Spore (**Abbildung 4**) (O'Donell and McLaughlin, 1984).

Die molekulare Charakterisierung der *don1* und *don3* Mutanten, die im letzten Schritt der Zellteilung, in der Separation der Mutter- und Tochterzellen, beschädigt sind, zeigte, dass an der Regulation der Zelltrennung in *U. maydis* ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (Don1) spezifisch für kleine GTPasen der Rho/Rac-Familie und eine Ste20-ähnliche Proteinkinase (Don3) beteiligt ist (Weinzierl *et al.*, 2002). Das Don1 Protein weist eine hohe Homologie zum humanen FGD1-Protein auf, das für das rezessive X-chromosomale Aarskog-Scott Syndrom (FGDY, faciogenital dylplasia) verantwortlich ist (Pasteris *et al.*, 1994). Beide Proteine enthalten eine PH Domäne, eine GEF Domäne und eine Cystein-reiche FYVE Zn-Finger Domäne. Während die GEF Domäne für den GDP/GTP Austausch der Rho/Rac/Cdc42 Proteine verantwortlich ist, dienen die PH und FYVE Zn-finger Domäne zur Membranbindung. Dabei interagieren sowohl die PH-Domäne als auch der Zn-Finger spezifisch mit membrangebundenen Phosphatidylinositol-Derivaten. Die PH-Domäne erkennt Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PI(3,4)P₂) bzw. PI(3,4,5)P₃ und die FYVE Zn-Finger Domäne bindet an PI(3)P, das spezifisch für die Membranen der Endosomen ist (Simonsen *et al.*, 2001).

Das Don3 Protein enthält eine konservierte N-terminale Serin/Threonin Proteinkinase Domäne, die charakteristisch für die Ste20/p65^{PAK}-ähnlichen Proteine ist. Don3 weist die größte Sequenzähnlichkeit zu der Severinkinase von *Dictyostelium discoideum* auf. Severinkinase phosphoryliert Severin, ein Ca²⁺-abhängiges, F-Aktin fragmentierendes Protein. Außerdem ist Don3 sehr ähnlich zu der Human SOK-1 Kinase, die bei oxidativem Stress aktiviert wird. Don3 enthält keine klassische Cdc42-Bindungsdomäne (CRIB-Domäne) und gehört damit in die Germinal Center Kinase (GCK) Subfamilie der Ste20-Kinasen. Ob und auf welche Weise Don3 direkt durch Cdc42 reguliert wird, ist noch unbekannt (Weinzierl *et al.*, 2002).

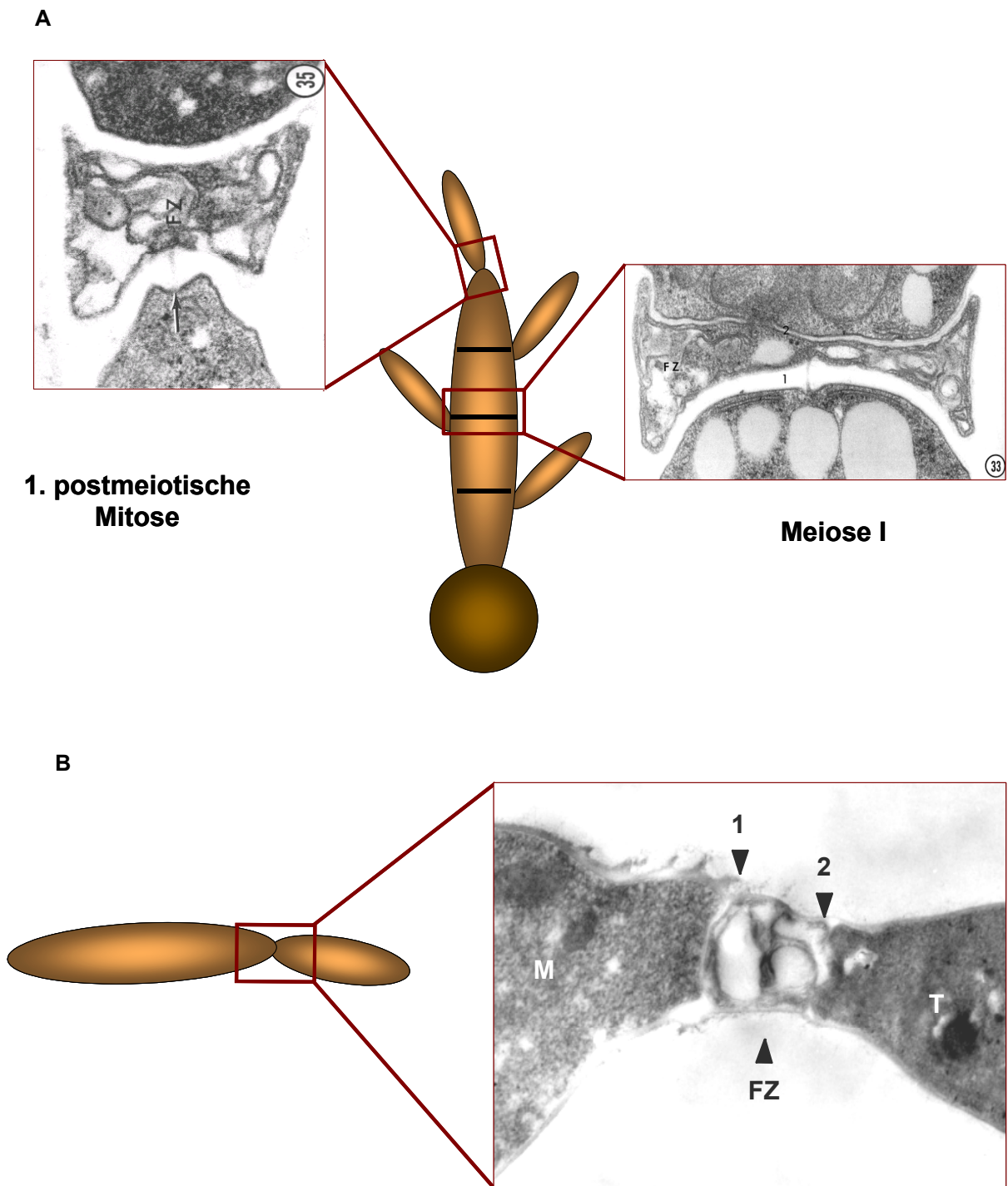


Abbildung 4: Septumbildung in *U. maydis* (O'Donell and McLaughlin, 1984; Weinzierl *et al.*, 2002). 1: primäres Septum 2: sekundäres Septum FZ: Fragmentierungszone M: Mutterzelle T: Tochterzelle (A) Septumbildung während der Meiose (O'Donell and McLaughlin, 1984). Nach der Auskeimung der Teliospore werden im Promycel drei Septen gebildet. Bei der ersten postmeiotischen Mitose wird ein strukturell sehr ähnliches primäres und sekundäres Septum und eine Fragmentierungszone gebildet, wie es während der Mitose (B) zu beobachten ist.

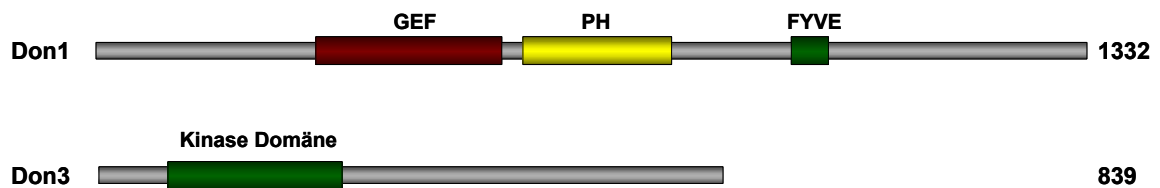


Abbildung 5: Domänenstruktur der *U. maydis* Don1 und Don3 Proteine. Das Don1 Protein gehört zu den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren und aktiviert durch seine GEF Domäne die kleine GTPase Cdc42. Es enthält außerdem eine PH und eine FYVE Zn-Finger Domäne, die für die Membranbildung verantwortlich sind. Don3 ist ein Mitglied der GCK Subfamilie der Ste20-ähnlichen Kinasen, und wird direkt oder indirekt durch Cdc42 aktiviert. Es verfügt über eine N-terminale Kinase-Domäne, enthält aber keine Interaktionsdomäne (CRIB) für Cdc42.

Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems konnte gezeigt werden, dass sowohl Don1 als auch Don3 spezifisch mit Cdc42 interagieren. Dies deutet darauf hin, dass in *Ustilago maydis* eine Cdc42-abhängige Signalkaskade die Cytokinese reguliert (**Abbildung 6**) (Weinzierl *et al.*, 2002).

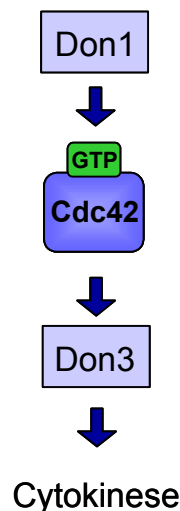


Abbildung 6: Cdc42-Septierungskaskade in *U. maydis*. Die kleine GTPase Cdc42 spielt eine Rolle in der Cytokinese in *U. maydis*. Die Aktivierung von Cdc42 erfolgt durch Don1. Aktives Cdc42 aktiviert direkt oder indirekt Don3, eine Proteinkinase, die für die Bildung des sekundären Septums benötigt wird.

2.1. Cdc42

Cdc42 gehört zur Rho/Rac-Familie kleiner Ras-ähnlicher GTPasen mit etwa 20-40 kDa Molekulargewicht. Diese fungieren in der Zelle als molekulare Schalter und steuern die räumliche und zeitliche Aktivität bestimmter Effektoren innerhalb der Zelle. Die kleinen GTPasen existieren in zwei Formen: Die GDP-gebundene Form ist inaktiv und die GTP-gebundene aktiv (Bourne *et al.*, 1990; Hall, 1990). Sie verhalten sich wie molekulare Schalter, die ein Signal in eine räumlich und zeitlich begrenzte Effektor-Antwort umwandeln (**Abbildung 7**).

Der limitierende Faktor in der GDP/GTP Austauschreaktion ist die Dissoziation von GDP von der GDP-gebundenen Form. Diese Reaktion ist sehr langsam und wird von einem Regulator (GEF, Guanine Nucleotide Exchange Factor) stimuliert (Takai *et al.*, 2001). Diese Bindung führt zu einer Konformationsveränderung in der Effektor-Bindedomäne, so dass diese Region in der Lage ist, mit Effektoren zu interagieren. Die endogene GTPase Aktivität der kleinen GTPasen ist ebenfalls sehr langsam und wird von GAPs (GTPase Activating Proteins) stimuliert. Diese sind in den meisten Fällen spezifisch für die jeweilige GTPase, wie Ras GAP oder Rab3 GAP (Boguski and McCormick, 1993; Fukui *et al.*, 1997; Trahey and McCormick, 1987). Andere GAPs, wie z.B. p190, die aktiv für Rho/Rac/Cdc42 Proteine ist, zeigen eine breitere Substratspezifität (Settleman *et al.*, 1992). Außerdem kann die Aktivität der GTPasen noch durch die Wechselwirkung mit GDIs (Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors) reguliert werden. Diese hemmen die Dissoziation von GDP von der GDP-gebundenen Form und halten die kleinen GTPasen in der GDP-gebundenen Form (**Abbildung 7**) (Fukumoto *et al.*, 1990).

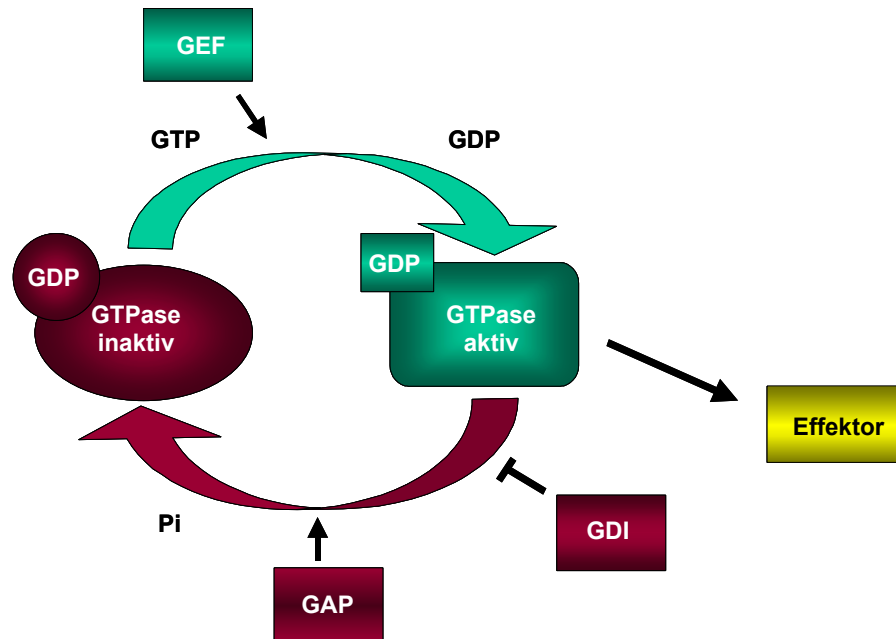


Abbildung 7: Regulation der GTPasen. Kleine GTPasen existieren in zwei Formen: die inaktive Form bindet GDP und die aktive Form GTP. Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (**GEF**) stimulieren die Dissoziation von GDP von der GDP-gebundenen Form. Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (**GDI**) hemmen die Dissoziation von GDP von der GDP-gebundenen Form und halten die kleine GTPase in der GDP-gebundenen Form. Die GTPase Aktivität jeder kleinen GTPase ist sehr langsam und wird von GTPase aktivierenden Proteinen (**GAP**) stimuliert.

Die kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 werden an ihrem C-Terminus durch Geranylgeranylierung bzw. Farnesylierung und Methylierung posttranslational modifiziert (Casey and Seabra, 1996; Zhang and Casey, 1996). Die Lipidmodifikationen dieser Proteine sind für die Lokalisierung an der Membran und für die Interaktion mit ihren Effektoren nötig (Casey and Seabra, 1996; Hancock *et al.*, 1990; Zhang and Casey, 1996). Rho/Rac/Cdc42 und Rab Proteine sind sowohl an der Plasmamembran als auch im Cytosol aufzufinden.

2.1.1. Struktur von Cdc42

Die bisher sequenzierten Cdc42 Proteine variieren in der Größe zwischen 190-192 Aminosäuren. Ähnlich wie Ras ist Cdc42 in vier Domänen gegliedert. Funktionell wichtig ist die Effektor- oder „switch I“ Domäne zwischen Aminosäure 26 und 50 (**Abbildung 8, rot**). Diese Domäne bildet eine $\beta 2$ Faltblattstruktur, die groß genug ist, um gleichzeitig mehrere Regulatoren oder Effektoren zu binden (Mackay and Hall, 1998). Eine andere Domäne, die sogenannte „Rho Insertionsdomäne“, ist in der Rho/Rac-Familie der kleinen GTPasen hochkonserviert. Sie wird von den Aminosäuren 120-139 (**Abbildung 8, lila**) gebildet und

dient für die Interaktion mit GAPs (McCallum *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997b) und GDIs (Wu *et al.*, 1997b). Die GEFs interagieren mit den Domänen zwischen Aminosäuren 82-100 und 140-150. Diese Bereiche flankieren somit die Rho-Insertionsdomäne (Mackay and Hall, 1998). Die Cdc42 Guanin-Nukleotid-Bindedomäne konnte anhand von Untersuchungen von aktiven und dominant negativen *cdc42* Mutanten in *S. cerevisiae* identifiziert werden (**Abbildung 8, blau**) (Ziman *et al.*, 1991).

Mutationen, wie z.B. der Austausch eines Glycin an Position 12 gegen Valin (Cdc42^{G12V}), die die GTPase-Aktivität von Cdc42 blockieren, führen, ähnlich wie bereits bei Ras beobachtet, zu einer dauerhaften Bindung von GTP. Solche mutierten Proteine sind deshalb konstitutiv aktiv. Es konnten auch Mutationen in Cdc42 identifiziert werden, die sich dominant negativ verhalten. Die Überexpression des dominant negativen Cdc42^{T17N} führt in Hefe zu Letalität (Johnson, 1999). Der Einsatz solcher Mutanten erleichtert die Untersuchung der Funktion von Cdc42 in Systemen, bei denen eine gezielte Mutagenese durch Genaustausch nicht möglich ist.

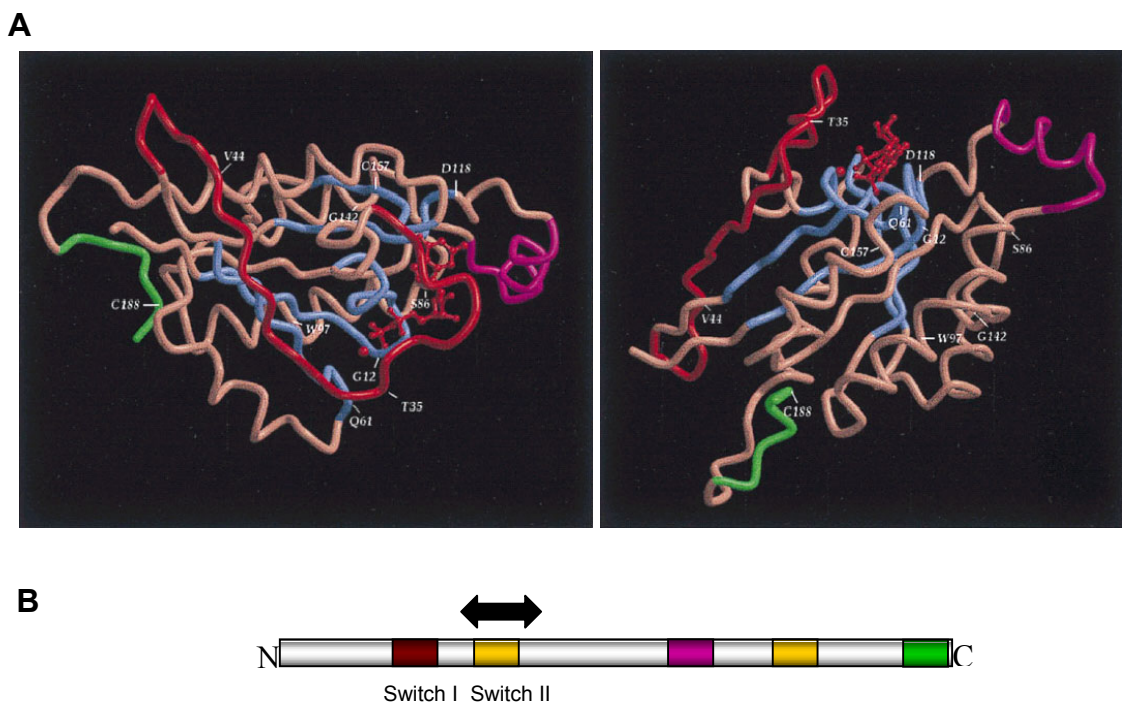


Abbildung 8: Cdc42p Röntgen-Kristallstruktur (Johnson, 1999). (A) Kristallstruktur von Cdc42Hs mit GDP aus zwei Sichten (B) Domänenstruktur von Cdc42. Die Farben für die konservierten Domänen entsprechen A. **Rot:** Effektor-Domäne, **Lila:** Rho Insertionsdomäne für GAP und GDI, **Blau:** GDP/GTP Bindedomäne, **Grün:** C-Terminus für posttranslationale Modifikationen, **Gelb:** GEF Interaktionsdomäne, **↔** Interaktion mit der CRIB Domäne

2.1.2. Effektoren von Cdc42

Viele Regulatoren und Effektoren von Rho/Rac/Cdc42 Proteinen sind bekannt, auch wenn ihre Funktionen noch nicht ganz geklärt sind (Mackay and Hall, 1998). Die Effektoren interagieren mit der aktiven (GTP-gebundenen) Form von Cdc42 und induzieren zahlreiche Prozesse, wie z.B. die Reorganisation des Aktin-Cytoskelettes und die Proteinkinase-abhängige Induktion der Transkription. Die Interaktion zwischen Cdc42 und seinen vielen Regulatoren und Effektoren muss zeitlich und räumlich kontrolliert werden, so dass Cdc42 zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus und an verschiedenen Orten in der Zelle seine Funktion ausüben kann. Cdc42 ist deshalb auch durch seine subzelluläre Lokalisation reguliert, die von seinem Prenylierungs-Zustand und von der Interaktion mit Gunainnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) abhängig ist (Mackay and Hall, 1998).

Der wichtigste Partner für die Effektor-Domäne von Cdc42 ist die CRIB Domäne (Cdc42/Rac Interactive Binding, auch PBD, GBD oder PAK Domäne) (**Abbildung 8, Pfeil**). Sie wurde in vielen Cdc42-abhängigen Effektoren gefunden, auch in den Proteinkinasen der PAK Subfamilie der Ste20-ähnlichen Kinasen (Burbelo *et al.*, 1995), jedoch enthalten nicht alle bekannten Effektoren von Cdc42 eine CRIB Domäne (Mackay and Hall, 1998).

PAKs (p21-aktivierte Kinasen) enthalten eine C-terminale Kinase Domäne und eine N-terminale p21-Bindedomäne (CRIB), flankiert von einer Prolin-reichen SH3-Bindedomäne (Knaus and Bokoch, 1998). In *S. cerevisiae* sind drei Mitglieder der PAK Familie von Serin/Threonin Proteinkinasen bekannt: Ste20p, Cla4p und Skm1p. Cla4p und Skm1p unterscheiden sich von Ste20p darin, dass sie noch eine zusätzliche Pleckstrin Homologie (PH) Domäne enthalten, die sich N-terminal von der CRIB Domäne befindet (Johnson, 1999).

Mitglieder der GCK (Germinal Center Kinase) Subfamilie enthalten keine CRIB Domäne, nur eine N-terminale Kinase Domäne. Das *U. maydis* Don3 Protein enthält ebenfalls keine CRIB Domäne und gehört auch aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit eindeutig in diese Subfamilie. In *S. cerevisiae* wurde bis heute nur ein Mitglied der GCK Subfamilie gefunden: Sps1p ist verantwortlich für Aktivierung später Gene während der Askosporenbildung (Percival-Smith and Segall, 1986).

3. Regulation der Zellpolarität in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Cdc42 GTPase wurde zuerst aus einer temperatursensitiven Mutante in *Saccharomyces cerevisiae* (*cdc42-1^{ts}*) isoliert, in der die Knospenbildung, aber nicht das Zellenwachstum bei 37°C blockiert war, was zur Bildung von vergrößerten, knospenlosen Zellen führte (Adams *et al.*, 1990). Obwohl die Zellteilung bei 37°C blockiert war, trat die DNA-Replikation und Kernteilung in den nächsten Zellzyklus. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die polarisierte Organisation der Aktin-Cytoskelett gestört war, was darauf hinweist, dass Cdc42 eine Rolle in der Aktin-Organisation spielt, die für das polarisierte Zellwachstum benötigt wird. Die Ablagerung von Chitin und anderen Zellwandbestandteilen war in *cdc42*-Mutanten gestört und erfolgte gleichmäßig verteilt über die gesamte Zellwand. Null-Mutanten von *cdc42* in *S. cerevisiae* und in *S. pombe* zeigen einen letalen Phänotyp (Johnson and Pringle, 1990; Miller and Johnson, 1994).

Die Herstellung der Zellpolarität ist wichtig für viele zelluläre und Entwicklungsprozesse, wie für die Bildung der Zellform, für intrazelluläre Bewegungen der Organellen und für die Sekretion und Ablagerung von Zellwandmaterial (Drubin and Nelson, 1996). Die Initiation der Zellpolarität während des mitotischen Zellzyklus in Hefe passiert in drei Schritten: (i) Selektion der Knospungsstelle, (ii) Organisation von Proteinen an der Knospungsstelle, und (iii) polarisiertes Wachstum der Knospe.

Durch genetische und biochemische Untersuchungen konnten mehr als 25 Proteine identifiziert werden, einschließlich mehrerer GTPasen und Komponenten des Aktin-Cytoskeletts, die bei der Regulation der Zellpolarität in *S. cerevisiae* eine Rolle spielen (Chant and Pringle, 1991; Drubin, 1991; Drubin and Nelson, 1996). Rsr1p/Bud1p gehören zu den Ras Proteinen und sind für die Bestimmung der Knospenbildungsstelle verantwortlich, aber nicht für die Knospenbildung oder für das polarisierte Wachstum (Bender and Pringle, 1989; Ruggieri *et al.*, 1992). Cdc42p ist beteiligt in der Bestimmung der Knospenbildungsstelle, der Knospenbildung, dem polarisierten Wachstum und für die Cytokinese (Johnson and Pringle, 1990; Johnson, 1993; Miller and Johnson, 1997; Ziman *et al.*, 1991). Rho Proteine regulieren die Knospenbildung, die Aktin-Reorganisation, das polarisierte Wachstum und die Aktivierung der β -Glukan Synthese (Johnson, 1999).

In der Hefe ist Aktin in Form kortikaler „patches“ und Aktin-Bündel organisiert. Beide Strukturen liegen unter der Plasmamembran sind und werden auf eine Zellzyklus-abhängige

Weise polarisiert (Amberg, 1998). Das Cdc42 Protein spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Polarisierung des Aktin-Cytoskeletts, indem es zu den wachsenden Stellen der Plasmamembran transportiert wird und dort seine Effektoren aktiviert, die das Aktin-Cytoskelett organisieren (Ziman *et al.*, 1993). In der Abwesenheit von Cdc42 sind zwar kortikale Aktin-„patches“ und Aktin-Bündel vorhanden, diese sind aber vollkommen desorganisiert, und die Zellen sind groß, rund und bilden keine Knospen (Adams *et al.*, 1990).

Die Knospungsstelle wird in Hefe zuerst durch das Protein Bud1p markiert. Dieses rekrutiert Cdc24p und Bem1p an einer bestimmten Stelle der Plasmamembran zu Beginn der G₁ Phase (**Abbildung 9**) (Park *et al.*, 1999). Dieser Komplex aktiviert Cdc42p, das über die Effektoren Cla4 und Ste20p das Aktin-Cytoskelett organisiert. Bevor die Knospe entsteht, werden Septin-Filamente durch Cdc42p-Cla4p Signalisierung in eine ringförmige Struktur organisiert (Cvrckova *et al.*, 1995; Richman *et al.*, 1999). Dies führt zu einer entsprechenden Einlagerung von Zellwandmaterial an der Knospungsstelle und zum polarisierten Wachstum der neu entstehenden Knospe (Pruyne and Bretscher, 2000).

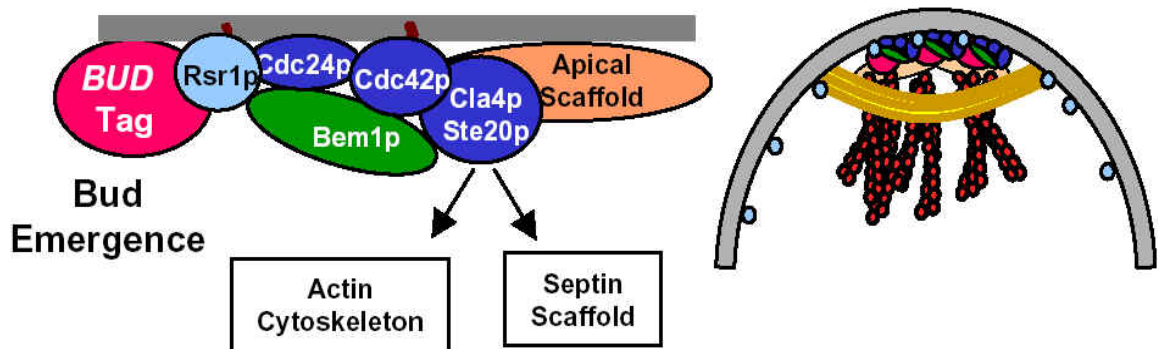


Abbildung 9: Funktionen der Cdc24p-Cdc42p-Effektor Komplexe an der Plasmamembran mit Scaffold Proteinen (Pruyne and Bretscher, 2000). Die Cdc42p aktivierten Effektoren, wie Ste20p, Cla4p, Gic1p and Gic2p, orientieren das Aktin-Cytoskelett (rot) auf den Cdc24p-Cdc42p Komplex (blau). Während der Knospenbildung markiert der Cdc24p-Cdc42p Komplex die Stelle der Knospenentstehung an der Plasmamembran. Das Bem1p Scaffoldprotein, die Bud-Proteine und die Rsr1 GTPase (hellblau) leiten die Knospenbildung. Die Proteine Ste20p, Cla4p, Gic1p und Gic2p organisieren die Bildung des Septin-Ringes (gelb). Für das apikale Wachstum werden die Proteine des Polarisoms als apikaler Scaffold, der Cdc24p-Cdc42p-Komplex und die Proteine der MAPK-Kaskade benötigt. Während Ste20p der wichtigste Effektor beim apikalen Wachstums ist, ist es Cla4p während des isotropischen Wachstums. Nach der Kontraktion des Aktomyosin Ringes lokalisieren Cdc24p, Cdc42p, die Septine und die Polarisom-Proteine am Mutter-Tochter-Hals und repolarisieren auch das Aktin-Cytoskelett zu dieser Stelle.

3.1. Septine als Scaffolds in der Polarisierung

Septine wurden zum ersten Mal bei der Suche nach temperatursensitiven Mutationen isoliert, die die Knospenbildung in *S. cerevisiae* regulieren. Es wurden ts-Mutationen in vier Genen gefunden, *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* und *cdc12*, die eine Verzögerung des Zellzyklus, Defekte im Knospenwachstum und in der Cytokinese bei der restriktiven Temperatur verursachen. Die vier Septine formen einen streng geordneten, kortikalen Komplex aus 7 bis 9 nm breiten Filamenten zwischen Mutter- und Tochterzelle. Das Septin-Netzwerk spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung des Chitin-Ringes und des Septums bei der Knospenbildung in *S. cerevisiae* (Field and Kellogg, 1999). Untersuchungen mit GFP Fusionsproteinen zeigten, dass die Septine in der späten G₁ Phase, 15 Minuten bevor die Knospe gebildet wird, einen diskreten Ring formen (Haarer and Pringle, 1987). Nach der Knospenbildung wird dieser Ring vergrößert und befindet sich kortikal am Hals, und die Struktur bleibt an dieser Stelle während des ganzen Zellzyklus. Während der Cytokinese wird der Septin-Ring geteilt und ist an der Mutter- und Tochterseite zu sehen. Der alte Ring kann bis zur Bildung des neuen Septin-Ringes des folgenden Zellzyklus beobachtet werden (Gladfelter *et al.*, 2001).

Septine wurden in den meisten Eukaryonten (außer Pflanzen) identifiziert (Longtine *et al.*, 1996) und sie spielen auch in Vertebraten eine Rolle in der Cytokinese, was zeigt, dass die Funktion der Septine in der Evolution konserviert ist.

4. Zielsetzung

Sequenzvergleiche wiesen darauf hin, dass das Don1 Protein ein Regulator (GEF) und Don3 ein Effektor für kleine GTPasen der Rho/Rac-Familie ist. Mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid-Systems konnte eine spezifische Bindung von Don1 und Don3 nur mit Cdc42 nachgewiesen werden. Um die Vermutung zu bestätigen, dass Cdc42 an diesem Signalweg beteiligt ist, sollte eine Epistasis-Analyse mit einer konstitutiv aktiven Variante des Cdc42 Proteins (Cdc42^{Q61L}) in *don1* und *don3* Zellen durchgeführt werden. Durch Mutagenese sollten weitere Mutanten isoliert werden, die einen ähnlichen Defekt in der Cytokinese aufweisen wie die *don*-Mutanten. Mit Hilfe dieser Mutanten können Komponenten identifiziert werden, die an der Regulation der Cytokinese durch die Don1/Cdc42/Don3 Kaskade beteiligt sind. Die neu isolierten Mutanten sollten durch genetische Untersuchungen bezüglich dieser Kaskade eingeordnet werden. Durch Komplementation sollten die betroffenen Gene isoliert werden und ihre Funktion bei der Regulation der Zellteilung durch molekulare Analyse dieser Gene aufgeklärt werden.

IV. MATERIAL UND METHODEN

5. Material und Bezugsquellen

5.1. Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

5.1.1. Chemikalien

Agar-Agar (Roth)	Hygromycin B (Invitrogen)
Agarose (PEQLAB)	IPTG (Roth)
Aktivkohle (Sigma)	Isopropanol (Roth)
Arabinose, L(+) (Roth)	Kaliumchlorid (Merck)
Ammoniumacetat (Roth)	Kaliumdihydrogenphosphat (Roth)
Ammoniumpersulfat (Roth)	Magnesiumchlorid (I.T.Baker)
Ammoniumsulfat (Roth)	Magnesiumsulfat (Merck)
Ampicillin (Roth)	Natriumacetat (Merck)
Bacto Agar (Difco)	Natriumchlorid (Roth)
Bacto Peptone (BD)	Natriumdihydrogenphosphat (Roth)
Bacto Yeast Extract (Difco)	Natrium-EDTA (Merck)
Calciumchlorid (Merck)	Natriumhydroxid (Roth)
Carboxin (Sigma)	Natriumsulfat (Roth)
Chloroform (Roth)	Paraffin flüssig (Merck)
Citronensäure (Roth)	Phenol (Roth)
Coffein (Sigma)	Polyethylenglycol (PEG 4000) (Sigma)
Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP,CTP, dGTP, dTTP) (Roth)	Potato Dextrose Broth (Difco)
Dinatriumhydrogenphosphat (Roth)	Saccharose (Roth)
Dithiothreitol (Roth)	Salzsäure (Roth)
EGTA (Roth)	SDS (Roth)
Ethanol (Roth)	Sorbitol (Sigma)
Ethidiumbromid (Roth)	Triton X-100 (Sigma)
Formaldehyd (37%) (Roth)	Trypton (Invitrogen)
Glukose (Roth)	Wasser (Braun)
Glutaraldehyde (Sigma)	X-Gal (Sigma)
Glycerin (87%) (Roth)	Yeast Extract (Invitrogen)
	Zitronensäure (Merck)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den Firmen Sigma, Merck, Invitrogen, und Roth bezogen.

5.1.2. Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (Ausubel *et al.*, 1987) und Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen können unter den jeweiligen Methoden aufgeführt sein.

Alkalische Phosphatase-Puffer (10×):

10 mM ZnCl₂

10 mM MgCl₂

100 mM Tris-Cl, pH 8,3

in H₂O_{bid.}

10% Glycerinlösung

11,5% (v/v) 87% Glycerin

in H₂O_{bid.}

0,25 M HCl

2,08% (v/v) HCl (37% p.a.)

in H₂O_{bid.}

Ampicillin-Lösung:

10 mg/ml Ampicillin

in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

Hygromycin B-Lösung:

50 mg/ml Hygromycin B

in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

Arabinoselösung

25% (w/v) Arabinose

in H₂O_{bid.}

100 mM IPTG-Lösung

2.38% (w/v) IPTG

in H₂O_{bid.}

Carboxin-Lösung:

5 mg/ml Carboxin

in Methanol, sterilfiltriert

Klenow-Puffer (10×):

100 mM MgCl₂

500 mM Tris-Cl, pH 7,5

in H₂O_{bid.}

Citrate/Phosphate Puffer:

50 mM Na₂HPO₄/Zitronensäure pH 5,6

40 mM EDTA pH 8,0

1,2 M Sorbitol

Ligase-Puffer (10×):

50 mM MgCl₂

660 mM Tris-Cl, pH 7,5

10 mM DTT

10 mM ATP

in H₂O_{bid.}

DNA-Auftragspuffer (6×):

50% (w/v) Sucrose

0,25% (w/v) Bromphenolblau

in TE-Puffer (1×) (s. u.), sterilfiltriert

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

in H₂O_{bid.}

0,5 M EDTA-Lösung:

0,5 M Na₂-EDTAx2H₂O

in H₂O_{bid.}, pH 8,0

20% Glukoselösung

20% (w/v) Glukose

in H₂O_{bid.}

Natriumphosphatpuffer (1 M):

1 M Na₂HPO₄1 M NaH₂PO₄

pH 7,0

PEM-Puffer

30 mM PIPES

5 mM EGTA

5 mM MgSO₄in H₂O_{bid.}, pH 6,7 äquilibriert

Novozym-Lösung:

2,5 bis 5 mg/ml Novozym

in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

Proteinase K Puffer:

50 mM EDTA pH 8,0

0,3% SDS

0,1 mg/ml Proteinase K

PCR-Puffer (10×):

500 mM KCl

100 mM Tris-HCl, pH 8,3

in H₂O_{bid.}

RNase A-Lösung:

10 mg/ml RNase A

15 mM NaCl

10 mM Tris-Cl, pH 8,0

in H₂O_{bid.}, 15 min. gekocht

Phenol, alkalisch (TE-Phenol):

dest. Phenol wird mit 0,18% (w/w)

8-Hydroxychinolin versetzt,

mit 0,5 M Tris-Cl, pH 8,0 äquilibriert

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8

1 M Sorbitol

in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert,

pH 5,8 mit

20 mM Citronensäure

1 M Sorbitol einstellen

Phenol, sauer (AE-Phenol).

dest. Phenol wird mit 0,18% (w/w)

8-Hydroxychinolin versetzt,

mit AE-Puffer (s. o.) äquilibriert

PIPES-Puffer:

50 mM PIPES, pH 6,5

100 mM NaCl

50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

1 mM Na₂-EDTA, pH 7,0

5% (w/v) SDS

in H₂O_{bid.}

SolA

50 mM Glukose

25 mM Tris-HCl pH 8.0

10 mM EDTA

in H₂O_{bid.}

SolB

0,2 M NaOH

1% SDS

in H₂O_{bid.}

PBS:

7,9 mM Na₂HPO₄×2H₂O14,5 mM KH₂PO₄0,5 mM MgCl₂

2,7 mM KCl

137 mM NaCl

in H₂O_{bid.}

SolC

3 M Kaliumacetat

pH 4,8

in H₂O_{bid.}

SSC (20×):

300 mM Na-Citrat, pH 7.0

3 M NaCl in H₂O_{bid.}

STC:

10 mM Tris-Cl, pH 7.5

100 mM CaCl₂

1 M Sorbitol

in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC/40% PEG:

40% (w/v) PEG 4000

60% (v/v) STC-Puffer

sterilfiltrieren

STET:

10 mM Tris-Cl, pH 8,0

100 mM NaCl

1 mM Na₂-EDTA

5% (v/v) Triton X-100

in H₂O_{bid.}

TAE (50×):

2 M Tris-Acetat

100 mM Na₂-EDTAin H₂O_{bid.}

TBE (5×):

500 mM Tris-Borat, pH 7,9

10 mM Na₂-EDTAin H₂O_{bid.}

TE (10×):

100 mM Tris-Cl, pH 7,9

10 mM Na₂-EDTAin H₂O_{bid.}

X-Gal-Lösung:

10 mg/ml X-Gal in

Dimethylformamid

Ustilago-Lysispuffer:

2% Triton

1% SDS

100 mM NaCl

10 mM Tris-Cl, pH 8,0

1 mM Na₂-EDTA

5.1.3. Medien

5.1.3.1. *E.coli* Medien

Für die Kultivierung von *E.coli* wurden folgende Medien verwendet:

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g Trypton

5 g Yeast Extract

10 g NaCl

mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Glycerin (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g Yeast Extract

16 g Trypton

5 g NaCl

800 ml 87% Glycerin

mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

16 g Trypton

10 g Yeast Extract

5 g NaCl

mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden Medienzusätze, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), X-Gal (40 µg/ml), IPTG (1mM).

5.1.3.2. *Ustilago maydis* Medien

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet:

PD-Charcoal-Festmedium:

24 g Potato Dextrose Broth

10 g Charcoal

20 g Bacto Agar

mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

140 mg MnCl₂ × 4 H₂O

400 mg ZnCl₂

40 mg NaMoO₄ × 2 H₂O

100 mg FeCl₃ × 6 H₂O

400 mg CuSO₄ × 5 H₂O

Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

16 g KH₂PO₄

4 g Na₂SO₄

8 g KCl

4 g MgSO₄ × 7 H₂O

1,32 g CaCl₂ × 2 H₂O

mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

60 mg H₃BO₃

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

100 mg Thiamin

50 mg Riboflavin

50 mg Pyridoxin

200 mg Calciumpantothenat

500 mg p-Aminobenzoessäure

200 mg Nikotinsäure

200 mg Cholinchlorid

1000 mg myo-Inositol
 Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert
 NSY-Glycerin (Einfriermedium):
 8 g Nutrient Broth
 1 g Yeast Extract
 5 g Saccharose
 800 ml 87% Glycerin
 mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Regenerationsagar (Schulz *et al.*, 1990):

a) Top-Agar:

1,5% (w/v) Bacto-Agar

1 M Sorbitol

in YEPS-Medium (s. u.)

b) Bottom-Agar:

wie a), nur zusätzlich 400 µg/ml Hygromycin oder
 4 µg/ml Carboxin, 80 µg/ml Phleomycin

PD-Medium:

24 g Potato Dextrose Broth

20 g Bacto Agar (für Platten)

mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

YEPS-Medium (Tsukada *et al.*, 1988):

10 g Yeast Extract

20 g Pepton

20 g Saccharose

mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Für Medien mit Arabinose oder Glukose als einziger Kohlenstoffquelle wurde der jeweilige Zucker nach dem Autoklavieren in einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 1% oder 2% zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml).

5.1.4. Farbstoffe

Tabelle 1: Verwendete Farbstoffe.

	Stock	verwendete Konzentration	Anregung (nm)	Emission (nm)	Herkunft
SYTO					
SYTO-11	5 mM in DMSO	10 nM	508	527	Molecular Probes S-7572 Kit S-7573
Calcofluor White	1 mg/ml in H ₂ O	2 µg/ml	358	461	Sigma, F3543
WGA					
Alexa Fluor® 350	1 mg/ml in PBS	12 µg/ml	346	442	Molecular Probes W-7024 Kit
Texas Red®-X			595	615	W-11263
Oregon Green 488					W-21405 W-6748
FM4-64	40 mM in H ₂ O	40 µM	515	640	Molecular Probes T-3166

5.1.5. Verwendete Antikörper und Goldpartikel

Tabelle 2: Verwendete Antikörper und Goldpartikel.

Antikörper, Goldpartikel	Herkunft	Verdünnung, Verwendung
mouse IgG1 α F-Actin	Cedarlane CLT 9001 Lot 83149722	1:250
mouse IgG1 α actin monoclonal (C4)	J. Lessard (Lessard, 1988)	15 μ g/ml
rabbit α mouse bridge	EMBL	1:80
Alexa Fluor® 594	Molecular Probes	1:500
goat α mouse IgG (H+L), F(ab') ₂ fragment conjugate	A-11020	
Protein A gold, 10nm	EMBL	1:60

5.1.6. Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von NEB Biolabs oder von Amersham bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit der Ausnahme von *Taq* DNA-Polymerase (Laborpräparation).

CIAP (Biolabs)	T4 Polynukleotid Kinase (Roche)
Lysozym (Boehringer)	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (Laborpräparation)
Novozym 234 (Novo Nordisc)	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (Promega)
Restriktionsenzyme (NEB, Amersham)	Klenow (USB)
T4 DNA-Ligase (Roche)	

5.1.7. Verwendete Kits und sonstiges Material

JETSORB® (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETSTAR® (Genomed) zur Plasmid-Maxipräparation, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, Megaprime Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, Thermo Sequenase™ Kit (Amersham Pharmacia Biotech) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, MobiSpin S-200 Säulen (Mo Bi Tech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

5.1.8. Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Verwendung
Sequenzierprimer		
M13 forward	gta aaa cga cgg cca gt	Sequenzierung von Klonierungsvektoren
M13 reverse	cag gaa aca gct atg acc	Sequenzierung von Klonierungsvektoren
T3 Scos1	caa tta acc ctc act aaa gg	Sequenzierung von Scos1 Derivaten
T7	taa tac gac tca cta tag gg	Sequenzierung von Cosmiden
Sequenzspezifische Primer		
MB123	gt GCG GCC GCt cag aga atg g	Für die Amplifizierung des <i>cdc42</i> Genes, mit eingebauter <i>NotI</i> Schnittstelle
MB130	ggc CAT ATG cag acc atc aag	Für die Amplifizierung des <i>cdc42</i> Genes, mit eingebauter <i>NdeI</i> Schnittstelle
MB265	gt GGA TCC CAT ATG tct ggc ttt cgt ggc acg	Amplifizierung des <i>cla4</i> Genes, mit eingebauten <i>BamHI</i> und <i>NdeI</i> Schnittstellen
MB266	gtg CCA TGG cac gat cgg gct tgt tgc g	Amplifizierung des <i>cla4</i> Genes, mit eingebauter <i>NcoI</i> Schnittstelle
MB299	cca cgc agc ttt cca tcg cc	Für die Mutationssuche im <i>cla4</i> Gen
MB300	gaa ggc tcc act gat ggg at	Für die Mutationssuche im <i>cla4</i> Gen
MB301	ctt tgt cca cca ggt tca tg	Für die Mutationssuche im <i>cla4</i> Gen
MB302	cac gtt gtc cat gat ctg cg	Für die Mutationssuche im <i>cla4</i> Gen
MB303	cgg agc gcc gta tca gca cc	Für die Mutationssuche im <i>cla4</i> Gen
MB304	gtg gca gca tcg ctg gct tg	Für die Mutationssuche im <i>cla4</i> Gen
MB328	GAG CTC aat tca gtt gtc gtt gc	Für die Herstellung der <i>cla4</i> -Nullmutante, mit eingebauter <i>SacI</i> Schnittstelle
MB329	GCG GCC GCa gac gct gtc tga tgg	Für die Herstellung der <i>cla4</i> -Nullmutante, mit eingebauter <i>NotI</i> Schnittstelle
MB330	GCG GCC GCa ggt gca ctc cct tcc c	Für die Herstellung der <i>cla4</i> -Nullmutante, mit eingebauter <i>NotI</i> Schnittstelle
MB331	GGA TCC gga atc aac cta caa gc	Für die Herstellung der <i>cla4</i> -Nullmutante, mit eingebauter <i>BamHI</i> Schnittstelle
MB336	gcg gcc gcg ctg gag ccg act cgg ca	Primer 1 (downstream) für die Wiedereinführung der L637P Mutation in das <i>cla4</i> Allel
MB337	cac atc ggt agg tgc acc tcc	Primer 2 (downstream) für die Wiedereinführung der L637P Mutation in das <i>cla4</i> Allel
MB338	gga ggt gca cct acc gat gtg	Primer 3 (upstream) für die Wiedereinführung der L637P Mutation in das <i>cla4</i> Allel
MB339	gcg gcc gcg gaa tca acc tac aag c	Primer 4 (downstream) für die Wiedereinführung der L637P Mutation in das <i>cla4</i> Allel

Vectorette Primer

MB180	gaa gga gag gac gct gtc tgt cga agg taa gga acg gac aag aga agg gag ag	Vectorette upper strand mit eingebauter <i>Pst</i> I Schnittstelle
MB181	ctc tcc ctt ctc gaa tcg taa ccg ttc gta cga gaa tcg ctg tcc tct cct tct gca	Vectorette lower strand mit eingebauter <i>Pst</i> I Schnittstelle
MB182	cga atc gta acc gtt cgt acg aga atc gct	Vectorette Linker-spezifischer Primer
MB183	gct tat cga tga taa gcg gtc aaa cat gag	pScos T7 Vectorette Primer
MB184	ata ggc gta tca cga ggc cct ttc gtc ttc	pScos T3 Vectorette Primer
MB193	ggt gca ctg aaa ctc tga c	Forward Primer für die Amplifizierung des 0,9 kb <i>doll</i> Vectorette Fragments für Sondenherstellung aus dem pTopo-doll-T3 Plasmid
MB194	cac ttg gag gcg att cac	Reverse Primer für die Amplifizierung des 0,9 kb <i>doll</i> Vectorette Fragments für Sondenherstellung aus dem pTopo-doll-T3 Plasmid

5.2. Stämme**5.2.1. *E. coli*-Stämme**

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5 α (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F', *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ* Δ M15. Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in pCR-Topo mit dem TOPO-TA Klonierungs-Kit (Invitrogen) wurde teilweise der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt. Für die Klonierung von Cosmid-DNA der genomischen Cosmid-Bibliothek wurde der Stamm XL1-Blue MR (Stratagene) mit dem Genotyp $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ verwendet.

5.2.2. *U. maydis*-Stämme**Tabelle 3: Ausgangsstämme.**

Stamm	Kreuzungstyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	–	(Banuett and Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2b2</i>	–	(Banuett and Herskowitz, 1989)
BUB8	<i>a2b4</i>	–	
FB6a	<i>a2 b1</i>	–	(Banuett and Herskowitz, 1989)
MB150	<i>a1b4</i>	–	
FBD11	<i>a1a2 b1b2</i>	–	(Banuett and Herskowitz, 1989)
BUB8 <i>don1</i>	<i>a2b4</i>	–	(Weinzierl <i>et al.</i> , 2002)
BUB8 <i>don3</i>	<i>a2b4</i>	–	(Weinzierl <i>et al.</i> , 2002)
FB1 Δ <i>cdc10</i>	<i>a1b1</i>	Hyg ^R	Bölker Labor (M. Piscator)
<i>don1Zn-fingerGFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	Bölker Labor (H. Hudel)

Tabelle 4: In dieser Arbeit hergestellte Stämme.

Stamm	Kreuzungstyp	Resistenz	Vorläufer, Herkunft/Plasmid	Nummer
<i>don1</i>	<i>a1b1</i>	–	BUB8 <i>don1</i> x FB1 Kreuzung	LL749
<i>don3</i>	<i>a1b1</i>	–	BUB8 <i>don3</i> x FB1 Kreuzung	LL750
170-2 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL751
170-3 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL752
190-2 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL753
8-11 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL754
8-12 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL755
8-13 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL756
8-14 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL757
8-15 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL758
8-17 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL759
8-19 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL760
8-20 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL761
8-21 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL762
8-22 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL763
8-24 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL764
8-25 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL765
8-26 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL766
8-27 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL767
8-28 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL768
8-29 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL769
8-30 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL770
8-31 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL771
8-32 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL772
8-33 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL773
8-34 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL774
8-35 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL775
8-36 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL776
8-40 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL777
8-41 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL778
8-50 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL779
8-52 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL780
8-53 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL781
8-55 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL782
8-57 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL783
8-58 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL784
8-59 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL785
8-63 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL786
8-64 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL787
8-65 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL788
8-66 (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL789
8-67 (B)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL790
8-68 (C)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL791
8-69 (D)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL792
8-70(E)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL793
8-71 (F)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL794
8-72 (G)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL795
<i>don4</i> (H)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL796
<i>don4-18</i>	<i>a2b4</i>	–	<i>don4</i> x FB1 Kreuzung	LL797
<i>don4-8</i>	<i>a1b1</i>	–	<i>don4</i> x FB1 Kreuzung	LL798
8-74 (I)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL799
<i>don5</i> (K)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL800
<i>don5-26</i>	<i>a2b1</i>	–	<i>don5</i> x FB1 Kreuzung	LL801
<i>don5-2</i>	<i>a1b2</i>	–	<i>don5</i> x FB1 Kreuzung	LL802
8-76 (M) (<i>don1</i>)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL803
8-77 (N)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL804
8-78 (O)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL805

<i>doll</i> (P)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL806
<i>doll-1</i>	<i>a1b1</i>	–	<i>doll</i> x FB1 Kreuzung	LL807
8-80 (Q)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL808
<i>cla4</i> (R)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL809
<i>cla4-18</i>	<i>a2b1</i>	–	<i>cla4</i> x FB1 Kreuzung	LL810
<i>cla4-28</i>	<i>a2b4</i>	–	<i>cla4</i> x FB1 Kreuzung	LL811
<i>cla4-7</i>	<i>a1b1</i>	–	<i>cla4-28</i> x MB150 Kreuzung	LL812
<i>don6</i> (S)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL813
<i>don6-14</i>	<i>a1b4</i>	–	<i>don6</i> x FB1 Kreuzung	LL814
<i>don6-21</i>	<i>a2b1</i>	–	<i>don6</i> x FB1 Kreuzung	LL815
8-83 (T)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL816
8-84 (U)	<i>a2b4</i>	–	BUB8, Mutagenese	LL817
BUB8 <i>cdc10GFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	BUB8, <i>p123cdc10GFP</i>	LL818
<i>don1cdc10GFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don1, p123cdc10GFP</i>	LL819
<i>don3cdc10GFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don3, p123cdc10GFP</i>	LL820
<i>don5cdc10GFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don5, p123cdc10GFP</i>	LL821
<i>don6cdc10GFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don6, p123cdc10GFP</i>	LL822
BUB8 <i>Zn-fingerGFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	BUB8, <i>p123don1Zn-fingerGFP</i>	LL823
<i>don3Zn-fingerGFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don3, p123don1Zn-fingerGFP</i>	LL824
<i>don4Zn-fingerGFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don4, p123don1Zn-fingerGFP</i>	LL825
<i>don5Zn-fingerGFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don5, p123don1Zn-fingerGFP</i>	LL826
<i>cla4Zn-fingerGFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>cla4, p123don1Zn-fingerGFP</i>	LL827
BUB8 <i>cla4GFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	BUB8, <i>p123cla4GFP</i>	LL828
FB1 <i>cla4GFP</i>	<i>a1b1</i>	Cbx ^R	FB1, <i>p123Umcla4GFP</i>	LL829
<i>cla4cla4GFP</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>cla4, p123Umcla4GFP</i>	LL830
FB1Δ <i>cdc10cla4GFP</i>	<i>a1b1</i>	Hyg ^R Cbx ^R	FB1Δ <i>cdc10, p123cla4GFP</i>	LL831
FB2 <i>cla4ÜE</i>	<i>a2b2</i>	Cbx ^R	FB2, <i>pRU11ΔNotI-Umcla4GFP</i>	LL832
<i>don1Cdc42^{Q61L}</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don1, pRU11ΔNotI-cdc42-Q61L</i>	LL833
<i>don3Cdc42^{Q61L}</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don3, pRU11ΔNotI-cdc42-Q61L</i>	LL834
<i>cla4Cdc42^{Q61L}</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>cla4, pRU11ΔNotI-cdc42-Q61L</i>	LL835
<i>don5Cdc42^{Q61L}</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don5, pRU11ΔNotI-cdc42-Q61L</i>	LL836
FB2 <i>Cdc42^{T17N}</i>	<i>a2b2</i>	Cbx ^R	FB2, <i>pRU11ΔNotI-cdc42-T17N</i>	LL837
<i>don3Cdc42^{T17N}</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don3, pRU11ΔNotI-cdc42-T17N</i>	LL838
FB1 <i>Cdc42^{V44A}</i>	<i>a1b1</i>	Cbx ^R	FB1, <i>pRU11ΔNotI-cdc42-V44A</i>	LL839
<i>don6Cdc42</i>	<i>a2b4</i>	Cbx ^R	<i>don6, pRU11ΔNotI-cdc42</i>	LL840

In fast allen Fällen wurden mindestens zwei unabhängige Transformanten hergestellt und für die weiteren Experimente verwendet.

5.3. Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

5.3.1. Ausgangsplasmide

pUC18	Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.
pTZ18R (Pharmacia)	Klonierungsvektor, Derivat von pUC19 mit verändertem Polylinker, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.
pScos UARS Cbx	Klonierungsvektor für die Aufnahme großer DNA-Fragmente. Enthält eine Carboxin-Resistenzkassette, die UARS und cos-Bereiche.
p123	Enthält das eGFP-Gen unter der Kontrolle des etef-Promotors, den nos-Terminator am 3'-Ende des <i>egfp</i> -Gens sowie eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion in <i>U. maydis</i> .
pRU11 (Brachmann, 2001)	Enthält den regulierbaren <i>crgl</i> -Promotor und eine Carboxin-Resistenzkassette.
pNEBUH	Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette, die UARS-Sequenz und den Polylinker von pNEB193.
pBS KS-II(+) (Stratagene)	Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.
pCR-Topo (Invitrogen)	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die entsprechenden PCR-Produkte können mit EcoRI wieder ausgeschnitten werden; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.
p123 <i>don1</i> Zn-fingerGFP	Die Zn-finger Domäne des Don1 Proteins wurde als GFP Fusion in den p123 Vektor kloniert (H. Hudel).
p123 <i>cdc10</i> GFP	Der ORF des <i>cdc10</i> Gens wurde als GFP Fusion in den p123 Vektor kloniert (H. Hudel).
pRU11Δ <i>NotI</i> - <i>cdc42</i>	Der ORF des <i>cdc42</i> Gens wurde in den pRU11Δ <i>NotI</i> Vektor kloniert (Mahlert, 2002).
pRU11Δ <i>NotI</i> - <i>cdc42</i> -Q61L	Das <i>cdc42</i> ^{Q61L} Allel wurde in pRU11Δ <i>NotI</i> kloniert (M. Piscator).
pRU11Δ <i>NotI</i> - <i>cdc42</i> -T17N	Das <i>cdc42</i> ^{T17N} Allel wurde in pRU11Δ <i>NotI</i> kloniert (M. Piscator).
pRU11Δ <i>NotI</i> - <i>cdc42</i> -V44A	Das <i>cdc42</i> ^{V44A} Allel wurde in pRU11Δ <i>NotI</i> kloniert (M. Piscator).

5.3.2. In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pSCos <i>Umcla4</i>	Das komplementierende etwa 43 kb Cosmid, das die Mutation in der <i>cla4</i> Mutante komplementiert hatte und die Cbx ^R -Kassette trägt. Es wurde für weitere Subklonierungen verwendet. In die <i>Bam</i> HI Schnittstelle des pSCos UARS Cbx Cosmids wurde partiell mit <i>Mbo</i> I geschnittene genomische <i>U. maydis</i> DNA ligiert.
pSCos <i>Umcla4</i> Δ <i>Bam</i> HI	Das pSCos <i>Umcla4</i> Cosmid wurde nach einem <i>Bam</i> HI Verdau religiert und es ergab ein etwa 28 kb Plasmid, das die <i>cla4</i> Mutation komplementierte. Dieses Cosmid wurde für weitere Subklonierungen verwendet.
pNEBUH8 <i>Bam</i> HI	8 kb <i>Bam</i> HI Fragment aus pSCos <i>Umcla4</i> in pNEBUH ligiert. Keine Komplementation der <i>cla4</i> Mutation.

pNEBUH3 <i>EcoRI</i>	3 kb <i>EcoRI</i> Fragment aus pSCos <i>Umcla4ΔBamHI</i> in pNEBUH kloniert. Keine Komplementation der <i>cla4</i> Mutation.
pSCos <i>Umcla4ΔHindIII</i>	22 kb <i>HindIII</i> Fragment aus pSCos <i>Umcla4ΔBamHI</i> religiert. Dieses Plasmid komplementierte die <i>cla4</i> Mutation und wurde für weitere Subklonierungen verwendet.
pNEBUH2,8 <i>EcoRI-HindIII</i>	2,8 kb <i>EcoRI-HindIII</i> Fragment aus pSCos <i>Umcla4ΔHindIII</i> in pNEBUH kloniert. Keine Komplementation der <i>cla4</i> Mutation.
pNEBUH1,7 <i>EcoRI-HindIII</i>	1,7 kb <i>EcoRI-HindIII</i> Fragment aus pSCos <i>Umcla4ΔHindIII</i> in pNEBUH kloniert. Keine Komplementation der <i>cla4</i> Mutation.
pBS3 <i>PstI</i>	3 kb <i>PstI</i> Fragment aus pSCos <i>Umcla4ΔBamHI</i> Cosmid in pBS KS-II (+) kloniert. Enthält ein Methyltransferase Homolog.
pBS2,2 <i>PstI</i>	2,2 kb <i>PstI</i> Fragment aus pSCos <i>Umcla4ΔHindIII</i> Cosmid in pBS KS-II (+) kloniert. Das Fragment trägt die 5'-Hälfte des <i>cla4</i> Genes bis zur Kinase Domäne.
pBS4,7 <i>HindIII-NotI</i>	4,7 kb <i>HindIII-NotI</i> Fragment aus pSCos <i>Umcla4ΔHindIII</i> in pBS KS-II (+) Vektor kloniert.
pNEBUH4,7 <i>HindIII-NotI</i>	Das gleiche 4,7 kb <i>HindIII-NotI</i> Fragment wie in pBS4,7 <i>HindIII-NotI</i> wurde für Komplementationsversuche in pNEBUH kloniert. Keine Komplementation der <i>cla4</i> Mutation.
pBS <i>Umcla4-7,8HindIII-NotI</i>	7,8 kb <i>HindIII-NotI</i> Fragment aus pSCos <i>Umcla4ΔHindIII</i> in pBS KS-II (+) Vektor kloniert.
pNEBUH <i>Umcla4-7,8HindIII-NotI</i>	Das gleiche 7,8 kb <i>HindIII-NotI</i> Fragment wie in pBS7,8 <i>HindIII-NotI</i> wurde für Komplementationsversuche in pNEBUH kloniert. Der Fragment komplementierte die Mutation in der <i>cla4</i> Mutante.
pBS <i>UmclaΔSalI</i>	3,6 kb <i>SalI</i> Fragment aus pBS7,8 <i>HindIII-NotI</i> Plasmid religiert. Das Plasmid enthielt den 3'-Terminus des <i>cla4</i> Genes.
pBS0,7 <i>EcoRI-PstI</i>	0,7 kb <i>EcoRI-PstI</i> Fragment aus pBS7,8 <i>HindIII-NotI</i> in pBS KS-II (+) kloniert. Der Fragment enthielt einen Teil des <i>cla4</i> Genes (zwischen der CRIB und Kinase Domäne).
pBS1,4 <i>SalI</i>	1,4 kb <i>SalI</i> Fragment aus pBS7,8 <i>HindIII-NotI</i> in pBS KS-II (+) kloniert. Der Fragment enthielt einen Teil des <i>cla4</i> Genes (PH und CRIB Domäne).
pBS0,9 <i>SalI</i>	0,9 kb <i>SalI</i> Fragment aus pBS7,8 <i>HindIII-NotI</i> in pBS KS-II (+) kloniert. Der Fragment enthielt einen Teil des <i>cla4</i> Genes (mittlerer Teil der Kinase Domäne).
pBS1,1 <i>SalI</i>	1,1 kb <i>SalI</i> Fragment aus pBS7,8 <i>HindIII-NotI</i> in pBS KS-II (+) kloniert. Der Fragment enthielt einen Teil vor dem <i>cla4</i> Gen (wahrscheinliche Promotor Region).
pBS0,7 <i>SalI</i>	0,7 kb <i>SalI</i> Fragment aus pBS7,8 <i>HindIII-NotI</i> in pBS KS-II (+) kloniert. Der Fragment enthielt einen Teil vor dem <i>cla4</i> Gen.

p123 <i>Umcla4</i> GFP	Das <i>cla4</i> Gen wurde mithilfe der MB265 (mit eingebauter <i>Bam</i> HI und <i>Nde</i> I Schnittstellen) und MB266 (mit eingebauter <i>Nco</i> I Schnittstelle) Primer amplifiziert. Die Amplikon wurde mit den <i>Bam</i> HI und <i>Nco</i> I Enzymen nachgeschnitten und in p123 GFP <i>Bam</i> HI/ <i>Nco</i> I Vektor vor dem <i>gfp</i> Gen kloniert.
pRU11Δ <i>Not</i> I- <i>Umcla4</i> -GFP	Das 2,5 kb <i>cla4gfp</i> Fragment wurde aus dem p123 <i>Umcla4</i> GFP Plasmid mit den <i>Nde</i> I und <i>Nco</i> I Enzymen eluiert und in den pRU11Δ <i>Not</i> I <i>Nde</i> I/ <i>Nco</i> I Vektor ligiert.
pTopo5-6 <i>cla4</i>	Das etwa 1 kb N-terminale Fragment des <i>cla4</i> Genes wurde mittels der MB303 und MB304 Primer amplifiziert und in den pCR-Topo Vektor für weitere Sequenzierungen kloniert.
pTopo5-6wt	Das etwa 1 kb N-terminale Fragment der Wildtyp Allel des <i>cla4</i> Genes wurde mittels der MB303 und MB304 Primer amplifiziert und in den pCR-Topo Vektor für weitere Sequenzierungen kloniert.
pTopo-down <i>cla4</i> KO	Das etwa 1 kb lange, vor dem START-Kodon des <i>cla4</i> Genes liegende Fragment wurde für die Konstruktion der <i>cla4</i> -Nullmutante mithilfe der MB328 (mit eingebauter <i>Sac</i> I Schnittstelle) und MB329 (mit eingebauter <i>Not</i> I Schnittstelle) Primer amplifiziert und die Amplikon wurde in pCR-Topo kloniert.
pTOPO-up <i>cla4</i> KO	Das etwa 0,5 kb lange, nach dem STOP-Kodon des <i>cla4</i> Genes liegende Fragment wurde für die Konstruktion der <i>cla4</i> -Nullmutante mithilfe der MB330 (mit eingebauter <i>Not</i> I Schnittstelle) und MB331 (mit eingebauter <i>Bam</i> HI Schnittstelle) Primer amplifiziert und die Amplikon wurde in den pCR-Topo Vektor kloniert.
pTZ18R <i>Umcla4</i> -up-down	Aus dem pTopo-down <i>cla4</i> KO Plasmid wurde der Insert mit den <i>Sac</i> I und <i>Not</i> I Enzymen, aus dem pTOPO-up <i>cla4</i> KO Plasmid mit den <i>Not</i> I und <i>Bam</i> HI Enzymen isoliert und sie wurden in den pTZ18R <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI Vektor kloniert. Dieser Konstrukt wurde für die Konstruktion der <i>cla4</i> -Nullmutante verwendet.
pTZ18R <i>Umcla4</i> -KO	Das pTZ18R <i>Umcla4</i> -up-down Plasmid wurde mit <i>Not</i> I linearisiert und mit CIAP dephosphoryliert. Die 2,9 kb Hyg ^R -Kassette wurde mit <i>Not</i> I aus dem pNEBUH Vektor eluiert und in die <i>Not</i> I Schnittstelle des pTZ18R <i>Umcla4</i> -up-down Plasmids ligiert. Die Orientierung der Hyg ^R -Kassette wurde mit einem <i>Xma</i> I- <i>Bam</i> HI Verdau überprüft: die + Orientierung ergab zwei Fragmente mit einer Größe von 4,7 kb und 2,5 kb (z.B. Klon 5), während die – Orientierung zu der Entstehung der 5,8 kb und 1,4 kb Fragmente (z.B. Klon 7) führte. Beide Klone wurden für die Herstellung der <i>cla</i> -Nullmutante verwendet.
pTopo- <i>don6cdc42</i>	Das <i>cdc42</i> Gen wurde in der <i>don6</i> Mutante mithilfe der MB123 und MB130 Primer amplifiziert und die Amplikon wurde in den pCR-Topo Vektor kloniert und sequenziert.
pTopo-BUB8 <i>cdc42</i>	Das <i>cdc42</i> Gen wurde in dem Wildtyp-Stamm BUB8 mithilfe der MB123 und MB130 Primer amplifiziert und die Amplikon wurde in den pCR-Topo Vektor kloniert und sequenziert.
pTopo- <i>don5</i> -T7	Der 0,5 kb Insert wurde mittels Vectorette PCR mit den VP und T7 Primer aus mit dem pScos UARS Cbx Cosmid-Bank komplementierten <i>don5</i> Zellen amplifiziert und in den pCR TOPO Vektor kloniert. Bei der Herstellung der Vectorette-Reaktion wurde die genomische DNA mit <i>Nsi</i> I verdaut und mit den Vectorette Linker ligiert.

pTopo- <i>doll</i> -T3	Der 0,9 kb Insert wurde mittels Vektorette PCR mit den VP und T3 Primer aus mit dem pScos UARS Cbx Cosmid-Bank komplementierten <i>doll</i> Zellen amplifiziert und in den pCR TOPO Vektor kloniert. Bei der Herstellung der Vektorette-Reaktion wurde die genomische DNA mit <i>Pst</i> I verdaut und mit den Vektorette Linker ligiert.
pTopo- <i>doll</i> -T7	Der 0,8 kb Insert wurde mittels Vektorette PCR mit den VP und T7 Primer aus mit dem pScos UARS Cbx Cosmid-Bank komplementierten <i>doll</i> Zellen amplifiziert und in den pCR TOPO Vektor kloniert. Bei der Herstellung der Vektorette-Reaktion wurde die genomische DNA mit <i>Nsi</i> I verdaut und mit den Vektorette Linker ligiert.

5.3.2.1. Konstruktion einer freireplizierenden, genomischen Cosmid-Bank

Für die Komplementation von UV-Mutanten wurde eine freireplizierende genomische Cosmid-Bank hergestellt. Die Vorgehensweise richtete sich dabei nach dem Protokoll des SuperCos I Cosmid Vector Kits (Stratagene). Dazu wurde aus dem *U. maydis* Stamm FBD11 (*a1a2 b1b2*) hochmolekulare DNA isoliert und etwa 180 µg DNA mit 1 U *Mbo*I 17 min lang bei 37 °C partiell verdaut, so dass 35 – 45 kb große Fragmente entstehen, die nach Dephosphorylierung mit den *Bam*HI/*Xba*I geschnittenen Armen des Cosmid-Vektor pSCos UARS Cbx ligiert wurden. Die Isolierung von Plasmid-DNA des Vektors pSCos UARS Cbx erfolgte mit Hilfe des Large-Construct Kits (Qiagen). Anschließend wurde der Ligationsansatz mit Hilfe des Gigapack® III Gold Packaging Kits (Stratagene) in λ-Phagenköpfe verpackt. Im Anschluss an die Verpackung in λ-Phagen erfolgte eine Titration der Cosmidgenbank in *E. coli* XL1-Blue MR-Zellen auf LB-Agarplatten unter Selektion auf Ampicillin-Resistenz. Einzelne Bakterienkolonien wurden in eine geordnete Bank aus 42 96er Mikrotiter-Platte organisiert, für Komplementationsversuche wurden die Cosmide aus Bakterien in jeder Mikrotiter-Platte präpariert und ergaben so eine geordnete Cosmid-DNA-Bank aus 42 Pools. Für weitere Hybridisierungsversuche wurden die einzelnen Bakterienkolonien in jeder Mikrotiter-Platte auf Biotin A Membranfilter transferiert, die Zellen wurden aufgeschlossen und ihre DNA an die Membran gebunden, was 42 Membranfilter mit jeweils 96 Cosmiden ergab. Außer der geordneten Bank wurde auch eine ungeordnete Bank aus neun Pools hergestellt, die jeweils etwa 1000 einzelne Bakterienkolonien enthielten. Es wurde aus diesen Bakterienpools DNA isoliert und für weitere Komplementationsversuche eine ungeordnete Cosmid-DNA-Bank erstellt.

5.3.2.2. Strategie zur Isolierung des *cla4*-Gens

Das pScosUm*cla4*Δ*Bam*HI Cosmid, das die Mutation in der *cla4* Mutante komplementierte, wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen für die Kartierung und für weitere mögliche Subklonierungen verdaut, wovon das *Hind*III Verdau Fragmente mit einer Größe von etwa 22 kb, 2,6 kb, 1,6 kb, 1,7 kb, 1,3 kb und 0,3 kb ergab. Um die komplementierende Sequenz einzugrenzen wurde das 1,6 kb *Hind*III Fragment als radioaktive Probe genommen, um in der geordneten pScos UARS Cbx Cosmid-Bank überlappende Cosmide zu suchen, die die Mutation in der *cla4* Mutante ebenfalls komplementieren (**Abbildung 10**). Durch die Restriktionskartierung dieser weiteren Cosmide mit verschiedenen Restriktionsenzymen konnte bestimmt werden, welche Fragmente sie gemeinsam haben, die das komplementierende Gen in sich tragen können. Die Hybridisierung mit dem 1,6 kb radioaktivem *Hind*III Fragment zu den Membran-gebundenen geordneten Cosmid-DNA-Pools ergab acht positive Signale. Diese Cosmide wurden einer Restriktionskartierung mit *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, *Hind*III, *Sal*I,

*Bam*HI/*Eco*RI und *Hind*III/*Sma*I Enzymen und Enzymkombinationen unterzogen, und anhand ihrer Fragmentmuster konnten sie in fünf Komplementationsgruppen eingeteilt werden (Tabelle 5). Aus jeder Gruppe wurde jeweils ein Cosmid für die Komplementation der *cla4* Mutante getestet und es wurde nur das 40G2 Cosmid (Gruppe 5) als komplementierend gefunden.

Tabelle 5: Mit dem pScos*Umcla4*Δ*Bam*HI Cosmid überlappende Cosmide.

Gruppe	Cosmid	Komplementation
1	25A3 25B12	–
2	26B4	–
3	37F2 37F7	–
4	37G3	–
5	40F5 40G2	+

Das *Sal*I Verdau des 40F5 komplementierenden Cosmids zeigte, dass es die interne und später für die Subklonierung verwendete 0,9 kb, 1,1 kb, 1,4 kb, 0,2 kb und 0,7 kb *Sal*I Fragmente (**Abbildung 11**) mit dem pScos*Umcla4*Δ*Bam*HI Originalcosmid gemeinsam hatte. Wie dieses Ergebnis vermuten ließ, enthalten die 40F5 und 40G2 Cosmide wahrscheinlich Sequenzen näher an der T7 Seite des pScos*Umcla4*Δ*Bam*HI Cosmids, während die nicht komplementierenden Cosmiden den größten Teil ihrer Sequenzen in der 5'-Richtung hatten (**Abbildung 10**).

Das etwa 22 kb *Hind*III Fragment aus dem pScos*Umcla4*Δ*Bam*HI Cosmid wurde ebenfalls religiert (pScos*Umcla4*Δ*Hind*III) und für die Komplementation in *cla4* Zellen transformiert. Da das Fragment die Mutation in *cla4* komplementierte, wurde er für die Restriktionskartierung mit den *Pst*I, *Eco*RI, *Pst*I/*Eco*RI, *Sph*I, *Sph*I/*Eco*RI, *Xba*I, *Xba*I/*Eco*RI, *Sal*I, *Sal*I/*Eco*RI, *Ssp*I, *Ssp*I/*Eco*RI, *Bgl*I, *Bgl*I/*Eco*RI, *Xho*I, *Xho*I/*Eco*RI, *Kpn*I, *Kpn*I/*Eco*RI, *Sac*I, *Sac*I/*Eco*RI, *Sma*I, *Sma*I/*Eco*RI Restriktionsenzymen und –Enzymkombinationen verdaut und aus den entstandenen Fragmentmustern ließ sich darauf schließen, dass die *Xba*I und *Kpn*I Enzyme keine Schnittstellen auf dem Fragment hatten. Eine grobe Restriktionskarte konnte erstellt werden, das pScos*Umcla4*Δ*Hind*III Cosmid wurde jedoch weiter subkloniert, um die komplementierende Sequenz näher einzugrenzen. Nach dem *Hind*III/*Not*I Doppelverdau wurden die zwei flankierenden Sequenzen des pScos*Umcla4*Δ*Hind*III Cosmids mit einer Größe von 7,8 kb (T7 Seite des Cosmids) und 4,7 kb (T3 Seite des Cosmids) isoliert und für weitere Komplementationsversuche in den *Ustilago* Vektor pNEBUH (pNEBUH*Umcla4*-7,8*Hind*III-*Not*I und pNEBUH4,7*Hind*III-*Not*I Konstrukte) und für die Kartierung und Sequenzierung in pBluescript KS-II (+) (pBS*Umcla4*-7,8*Hind*III-*Not*I und pBS4,7*Hind*III-*Not*I Konstrukte) kloniert. Das 4,7 kb *Hind*III-*Not*I Fragment komplementierte die Mutation in *cla4* Zellen nicht. Auf dem pBS4,7*Hind*III-*Not*I Plasmid liegende 3 kb *Eco*RI und 1,7 *Eco*RI-*Hind*III Fragmente wurden noch aus dem entsprechenden Verdau des pScos*Umcla4*Δ*Bam*HI (*Eco*RI Verdau) und des pScos*Umcla4*Δ*Hind*III Cosmids (*Eco*RI/*Hind*III Verdau) isoliert und in den pNEBUH Vektor kloniert (pNEBUH3*Eco*RI und pNEBUH1,7*Eco*RI-*Hind*III) und die zwei Klone wurden sequenziert. Nach der NCBI Blast Suche in der öffentlichen Sequenzbibliothek wurden auf dem 1,7 kb *Eco*RI-*Hind*III Fragment Homologien zum *S. cerevisiae*

Fre7 Protein (Ferric Reduktase Transmembran Komponent 7) gefunden (5e-07) (**Abbildung 10**). Das pBS4,7*HindIII*-*NotI* Plasmid wurde nicht weiter charakterisiert.

Das pNEBUH*Umcla4*-7,8*HindIII*-*NotI* Plasmid komplementierte die Mutation in der *cla4* Mutante, daher wurde es weiter subkloniert. Der 2,8 kb *HindIII*-*EcoRI* Subklon komplementierte die *cla4* Mutante nicht und das restliche 5 kb *EcoRI*-*NotI* Fragment konnte nicht erfolgreich subkloniert werden, so wurde das kleinste komplementierende 7,8 kb *HindIII*-*NotI* Fragment für weitere Subklonierungen und Sequenzierungen verwendet.

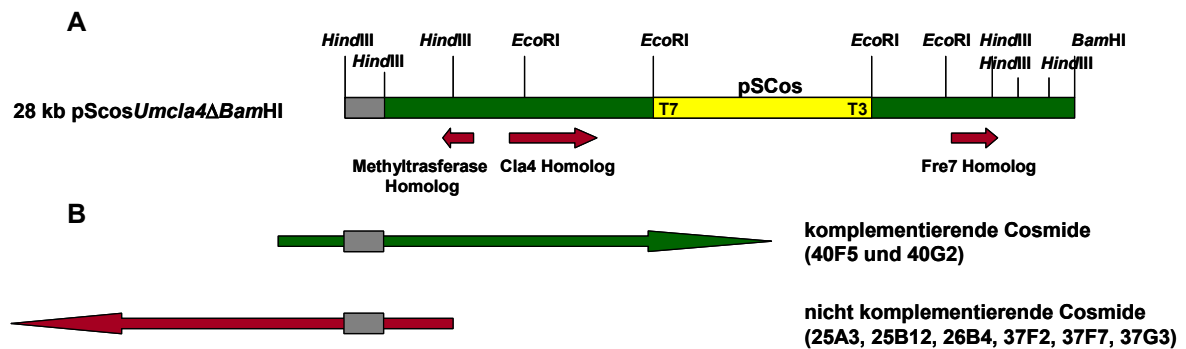


Abbildung 10: Durch Sequenzierung gefundene Homologen auf dem 28 kb pScos*Umcla4*Δ*BamHI* Cosmid. (A) Es wurden in den sequenzierten Regionen drei homologe Gene gefunden, ein Methyltransferase Homolog Gen und *cla4* auf der komplementierenden Seite und *fre7* auf der nicht komplementierenden Seite. **(B)** Das schattiert markierte 1,6 kb *HindIII* Fragment wurde als radioaktiv markierte Sonde verwendet, um überlappende Cosmide in der *U. maydis* Cosmid-Bank zu finden, die die Mutation in der *cla4* Mutante ebenso komplementieren. Es wurden zwei Cosmide (40F5 und 40G2) gefunden, die komplementierten und weitere sechs Cosmide (25A3, 25B12, 26B4, 37F2, 37F7, 37G3), die für die Komplementation negativ ausfielen. Ihre vermutliche Lage und Orientierung wurde schematisch dargestellt.

Das pBS*Umcla4*-7,8*HindIII*-*NotI* Plasmid, das das komplementierende Gen für die Mutation in der *cla4* Mutante auf sich trug, wurde mit *SalI*, *PstI*, *HindIII*/*EcoRI*, *EcoRI*/*PstI* Enzymen und Enzymkombinationen verdaut und die entstandenen Fragmente in den pBS KS-II (+) und in pNEBUH Vektoren subkloniert. Zwei *PstI* und *SalI* Fragmente, die das 7,8 kb *HindIII*-*NotI* Fragment an dem 5'-Ende begrenzten, wurden aus dem pScos*Umcla4*Δ*BamHI* Cosmid subkloniert (pBS3*PstI* und pBS0,9*SalI*). Die entstandenen pBS0,7*SalI*, pBS0,9*SalI*, pBS1,1*SalI*, pBS1,4*SalI*, pBS3,6*SalI*, pBS2,2*PstI*, pBS3*PstI*, pNEBUH2,8*HindIII*-*EcoRI* und pBS0,7*EcoRI*-*PstI* Plasmide wurden mit dem M13 Sequenzierprimerpaar in forward und reverse Richtungen sequenziert (**Abbildung 11**).

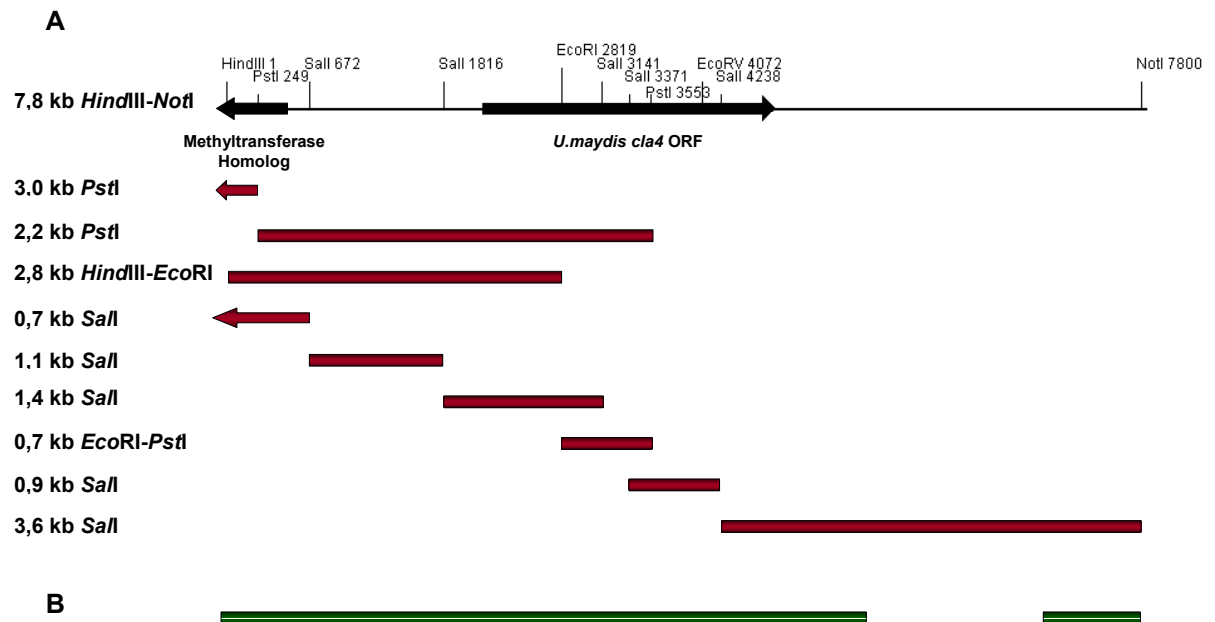


Abbildung 11: Das kleinste komplementierende 7,8 Kb *HindIII-NotI* Fragment: Restriktions-Kartierung des pBSUmcla4-7,8*HindIII-NotI* Plasmids und seine Sequenzierungsstrategie. (A) Restriktionskartierung und Sequenzierungsstrategie des pBSUmcla4,7,8*HindIII-NotI* Plasmids (B) Bekannte Regionen nach der Sequenzierung der Subklone.

6. Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

6.1. *Escherichia coli*

6.1.1. Kultivierung von *E. coli*

E. coli Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von LB-Amp Festmedien angeimpft. Die bei 80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf LB-Amp Festmedien ausgestrichen.

6.1.2. Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem UVIKON 860 Photometer (Kontron Instruments) bei 595 nm bestimmt. Als Nullwert wurde die OD₅₉₅ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₅₉₅ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

6.1.3. Elektroporations-Transformation von *E. coli*

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* DH5α wurde 1:200 in 200 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD₅₉₅ ≈ 0,5 geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf 4°C heruntergekühlt

und anschließend abzentrifugiert (5000 Upm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml kaltem 10%igen Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in kaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml kaltem 10%igen Glycerin aufgenommen. Die transformationskompetenten Zellen wurden in 50 µl Volumen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 50 µl Zellsuspension wurden mit bis zu 5 µl DNA aus einem Ligationsansatz gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gene Pulsers gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF, 2,5 kV, 200 W). Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 msec liegen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 1 ml LB-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

6.2. *Ustilago maydis*

6.2.1. Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

6.2.2. Induktion von Stämmen

Die Stämme wurden aus Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors Glucose als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu $OD_{595} \approx 0,5$ bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin in einer Verdünnung von 1:50 in Flüssigmedium überimpft, das induzierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle). Die Kulturen wurden bei 28°C und 180 Upm für die gewünschte Zeit geschüttelt.

6.2.3. Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem UVIKON 860 Photometer (Kontron Instruments) bei 600 nm bestimmt. Als Nullwert wurde die OD_{600} des jeweiligen Kulturmediums verwendet. $OD_{600} = 1,0$ entspricht etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml.

6.2.4. Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.* (Schulz *et al.*, 1990) und Gillissen *et al.* (Gillissen *et al.*, 1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:300 in 50 ml frischem YEPS-Medium verdünnt und bei

28°C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal $OD_{600} = 1,0$) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (4.200 Upm, 10 min, 4°C) geerntet, einmal mit 10 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 3 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (15-30 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang zweimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 4 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten vereinzelt.

6.2.5. Kreuzungsversuche bzw. Test auf filamentöses Wachstum

U. maydis-Stämme wurden von Platte in YEPS-Flüssigmedium inokuliert. Bei 28°C wurden die Zellen bis zu einer OD_{600} von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 4300 Upm für 7 min bei RT) und das Pellet anschließend in H_2O_{bid} so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa $OD_{600} = 5,0$ lag. Bei Kreuzungen wurde gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von jedem Ansatz wurden 5 µl auf eine PD-Charcoal-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Kreuzungsversuch anhand der Filamentbildung ausgewertet.

6.2.6. Konfrontationstest

Diese Methode ist in Snetselaar *et al.* (Snetselaar *et al.*, 1996) beschrieben. Die zu testenden Stämme wurden im PD Medium bei 28°C mit 180 Upm bis zu einer Dichte von $OD_{600} \approx 0,8$ geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert (4300 Upm, 5 min, RT) und bis zu einer $OD_{600} = 5,0$ in H_2O_{bid} resuspendiert. Objektträger wurden mit 2%igem Wasseragar in einer Höhe von ca. 2 mm beschichtet und 0,5 µl der Zellsuspension in einer Reihe auf den Objektträger getropft. Nach dem Eintrocknen der ersten Reihe (ca. 5 min) wurde der zweite Stamm in einer zweiten Reihe in etwa 100-200 µm Abstand getropft (0,5 µl). Nachdem die zweite Reihe eingetrocknet war, wurde über die Tropfen, die nahe aneinander lagen, sich aber nicht berührten, 3 µl Paraffinöl getropft. Diese Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert bis sie unter einem Phasenkontrast-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels DIC-Mikroskopie analysiert werden konnten.

6.2.7. Maisvarietäten (*Zea mays spec.*)

Für Spritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

6.2.8. Test auf Pathogenität

Etwa 14 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Tumore lichtmikroskopisch auf Sporenbildung untersucht.

6.2.9. Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden aus den Tumoren mit sterilem Zahnstocher Sporen isoliert und auf PD-Platten ausplattiert. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden wieder vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*alb1*), BUB8 (*a2b4*), MB150 (*alb4*) und FB6a (*a2 b1*) bestimmt.

6.2.10. UV-Mutagenese

Für die Isolierung neuer *don*-ähnlichen Mutanten wurde eine UV-Mutagenese durchgeführt. Die Energiemenge und die Bestrahlungszeit wurden so gewählt, dass die Überlebensraten bei 10-15% lagen. Für die UV-Mutagenese wurde der Stamm BUB8 (*a2b4*) bis $OD_{600} \approx 0,8$ in PD-Medium angezogen, pelletiert und mit $H_2O_{bid.}$ gewaschen. Die Gesamtzellzahl der Kulturen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 1×10^4 Zellen/ml in $H_2O_{bid.}$ eingestellt und in einem UV Stratalinker (Stratagene) mit 2000 erg/mm^2 (Wellenlänge der UV-Lampen: 254 nm) bestrahlt. Jeweils 200 μl der Zellsuspension wurde auf rechteckige PD-Platten ausplattiert und für drei Tage bei 28°C inkubiert. Als Kontrolle wurden 1×10^{10} nicht-mutagenisierte Zellen auf eine rechteckige PD-Platte ausgestrichen.

6.2.11. Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 63faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit einer numerischen Apertur von 1,4 verwendet. 3 μl der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: Calcofluor-Färbung, 365 nm und $>397 \text{ nm}$; eGFP, 450-490 nm und 515-565 nm. Aufnahmen wurden ebenfalls mit einem Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Leica TCS SP2 gemacht (Epifluoreszenz: Filtersystem blau (BP 450-490, LP 515), Filtersystem grün (BP 515-560, LP 590)) und mit dem Leica LCS Software abgespeichert und bearbeitet. Nachbearbeitungen erfolgten mit dem Programm PHOTOSHOP 6.0 (Adobe).

6.2.11.1. Fluoreszenz Mikroskopie

6.2.11.1.1. Fixierung der Zellen für Fluoreszenz Mikroskopie

Zellen wurden durch direkte Zugabe von 37%iger Formaldehyd-Lösung zum Medium bis zu einer Endkonzentration von 4% fixiert. Nach 30 min Inkubation auf einem Drehrad (Eppendorf) wurden die Zellen pelletiert (3.000 Upm, 10 min, RT), zweimal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert. Filamentöse Zellen erforderten zur Pelletierung eine längere Zentrifugation bei höheren Drehzahlen.

6.2.11.1.2. Färbungen

6.2.11.1.2.1. SYTO, Calcofluor White, Wheat Germ Agglutinin (WGA)

1,5 µl der zu mikroskopierenden Zellen wurde auf Objektträger getropft und dazu wurde der jeweilige Farbstoff in der Konzentration wie in dem Kapitel 5.1.4 angegeben dazugegeben.

6.2.11.1.2.2. FM4-64

Die FM4-64 Färbung wurde nach Kranz *et al.* (Kranz *et al.*, 2001) modifiziert durchgeführt. Die Zellen wurden kurz in Eppendorf Gefäßen abzentrifugiert und im gleichen Volumen frischem Medium aufgenommen. Der FM4-64 Farbstoff wurde in der angegebenen Konzentration (5.1.4) dazugegeben und die Zellen anschließend 10-15 min bei RT geschüttelt. Diese Zeit reichte aus, gleichzeitig Endosomen und Vakuolen in den Zellen beobachten zu können. Die Zellen wurden entweder gleich mikroskopiert oder zuerst kurz pelletiert und in H₂O_{bid.} aufgenommen.

6.2.11.1.2.3. Immunostaining

Immunostaining des Aktin-Cytoskeletts wurde nach Steinberg *et al.* (Steinberg *et al.*, 2001) modifiziert durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 37%iger Formaldehyd-Lösung direkt zum Medium bis zu einer Endkonzentration von 1% für 30 min fixiert, anschließend mit PBS gewaschen und auf Polylysin-behandelte Deckgläschen transferiert. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit mit PBS gewaschen und mit 3 mg/ml Novozyme 50 min protoplastiert. Die Zellen wurden demächst 1 min mit 1% Triton X-100 behandelt und mehrmals in PBS gewaschen, letztendlich in Blocking-Puffer (PBG: 0,2% Gelatine, 0,5% BSA in PBS) für 5 min inkubiert. Nach der Entfernung des Puffers wurden die Zellen mit der primären Antikörper-Lösung für 15 min inkubiert. Überflüssige Antikörper wurden mit 5mal Waschen mit Blocking-Puffer entfernt, und die Zellen wurden mit dem fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper für 15 min inkubiert. Nach weiteren 5 Waschschritten mit Blocking-Puffer wurden die Deckgläschen auf Objektträgern transferiert und mikroskopiert.

6.2.11.2. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden einerseits an der Philipps-Universität Marburg, FB Biologie-Zellbiologie in der Gruppe von Prof. Dr. Uwe Maier, andererseits auf dem EMBO Kurs an „Electron Microscopy, Immunocytochemistry and Sterology in Cell Biology“ bei EMBL in Heidelberg durchgeführt.

6.2.11.2.1. Fixierung der Zellen für Elektronenmikroskopie

Für die Strukturanalyse des Septums wurden die Zellen durch Zugabe von 8% Glutaraldehyd-Lösung (grade I) direkt zum Medium bis zu einer Endkonzentration von 4% fixiert. Die Zellen wurden nach 3 Stunden Inkubation bei 4°C pelletiert (4.200 Upm, 10 min). Das Pellet wurde dreimal in 0,1 M Phosphat-Puffer gewaschen, in demselben Puffer aufgenommen und bis zur Epon-Einbettung bei 4°C gelagert.

Für Immunogold Färbung wurden die Zellen durch Zugabe von 37%iger Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 3,7% und von 8% Glutaraldehyd-Lösung (grade I) direkt zum Medium bis zu einer Endkonzentration von 0,2% fixiert. Die Zellen wurden nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur pelletiert (4.200 Upm, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 3,7% Formaldehyd-Lösung in 0,1 M Phosphat-Puffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

6.2.11.2.2. Einbettung in Epon

Vor der Einbettung in Epon für die Strukturanalyse wurden die Zellen mit 1-2%iger Lösung von Osmiumtetroxid (OsO_4) nachfixiert (2x je 15 min). Anschließend wurden die Zellen mit einer Reihe von 30% (2x 15 min), 50% (2x 15 min), 70% (2x 15 min), 80% (2x 20 min), 90% (2x 20 min) absolut Alkohol (3x 20 min) entwässert. Nach der Entwässerung wurden die Zellen mit Propylenoxid/Epon 1:1 Mischung ÜN imprägniert und dann wurde die Probe mit reinem Epon bei 60°C in 48 Stunden polymerisiert.

6.2.11.2.3. Gefrierschnitte

Die fixierten Zellen wurden pelletiert und in 2,3 M Sucrose über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um die inneren Strukturen vor dem Einfrieren zu schützen. Danach wurde die Probe in die Form gebracht, auf einen speziellen Träger gestellt und in flüssigem N_2 schockgefroren. Bis zum Schneiden mit einem Cryomicrotome wurde die Probe hier aufbewahrt. Bei -120°C wurden mit dieser Methode 90-100 nm dicke Schnitte gemacht und für Immunostaining verwendet.

6.2.11.2.4. Immunogold Labelling

Ultradünne Schnitte (90-100 nm) auf dem Netz für EM wurden in Blocking-Puffer (PBG: 0,2% Gelatine, 0,5% BSA in PBS) für 5 min inkubiert. Nach der Entfernung des Puffers wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper für 15 min inkubiert. Überflüssige Antikörper wurden durch 5mal Waschen mit Blocking-Puffer entfernt, und die Schnitte wurden mit dem sekundären „rabbit anti mouse bridge“ Antikörper für 15 min inkubiert, da das Protein A Gold nur sehr schwache Affinität zu dem primären Antikörper (mouse IgG1 α F-Actin), aber gute Affinität zu dem Maus-Antikörper hatte. Nach weiteren 5 Waschschritten mit Blocking-Puffer wurden die Schnitte mit Protein A Gold 15 min inkubiert, was weitere 5 Waschschritten erforderte. Die

Nachkontrastierung erfolgte durch 5 min Inkubation in 0,3% Uranyl-Acetat/Methyl-Cellulose Mischung (3% UA und 2% MC 1:9 gemischt). Anschließend wurden die Proben mit einem Philips Elektronenmikroskop bei EMBL, Heidelberg mikroskopiert.

7. Molekularbiologische Standardmethoden

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA, bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD_{260} zu OD_{280} . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem UVIKON 860 Photometer (Kontron Instruments).

7.1. Isolierung von Nukleinsäuren

7.1.1. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (kochende Lyse)

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach (Sambrook *et al.*, 1989). 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT). Das Zellpellet wurde in 300 μl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 μl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 μl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 μl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 200 μl TE-Puffer mit 20 $\mu\text{g/ml}$ RNase A aufgenommen.

7.1.2. Maxipräparation von Cosmid- bzw. Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Maxicosmid- bzw. Maxi-plasmidpräparation wurde mit dem JETSTAR®-Kit von Genomed durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

7.1.3. Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 und dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütiges Zentrifugieren (15.000 rpm, RT) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneutem kurzem Zentrifugieren wurde das Pellet bei RT getrocknet und in einem kleinen Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ oder TE-Puffer gelöst.

7.1.4. DNA-Isolierung aus *U. maydis*

1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS-Flüssigmedium wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT), der Überstand abgossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNaseA aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

7.1.5. Isolierung hochmolekularer DNA aus *U. maydis*

Zellen des *U. maydis* Stammes FBD11 wurden in 250 ml PD-Medium bis $OD_{600} \approx 0,7$ angezogen und pelletiert (4.200 rpm, 8 min, RT). Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml Citrate/Phosphat-Puffer resuspendiert und erneut pelletiert (3.500 rpm, 8 min, RT), um es in 5 ml 10 mg/ml Novozym (in Citrate/Phosphate-Puffer) aufzunehmen. Die Zellen wurden darin bis zur vollständigen Abrundung protoplastiert und wiederum pelletiert (2.300 rpm, 10 min, RT). Das Pellet wurde in 10 ml TE aufgenommen und 2 ml Proteinase K-Puffer versetzt. Dieser Ansatz wird für 30 min bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wird zu dem Gemisch 5 ml 5M Na-Acetat gegeben und bei 4°C 30 min gelagert. Schließlich wurde zu der Lösung 10 ml 96% Ethanol gegeben und die DNA wurde abzentrifugiert (10.000 rpm, 15 min). Das Pellet wurde in 500 µl TE Puffer aufgenommen. Diese hochmolekulare DNA wurde für die Herstellung des Cosmid-Banks verwendet.

7.2. Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

7.2.1. DNA-Größenstandards

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden λ -DNA *Pst*I-Fragmente (Laborpräparate) verwendet:

λ -DNA *Pst*I-Fragmente:

11509 bp, 5077 bp, 4749 bp, 4507 bp, 2838 bp, 2560 bp, 2459 bp, 2443 bp, 2130 bp, 1936 bp, 1700 bp, 1159 bp, 1093 bp, 805 bp, 514 bp, 468 bp, 458 bp, 339 bp, 264 bp, 249 bp, 216 bp, 211 bp, 200 bp, 164 bp, 150 bp, 94 bp, 87 bp, bp, 15 bp

7.3. Sequenz- und Strukturanalyse

7.3.1. Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem DNA Sequencer model 4000 Sequenzierautomat (MWG Biotech) sequenziert. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen in einem Personal Cycler (Biotetra) und unter Verwendung des Thermo Sequenase™ Kits (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977): In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Ein 1,2 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel

aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software BaseImagIR v4.0 auf einem OS2 Rechner ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm Sequencher 4.0.5 exportiert werden.

7.3.2. Sequenz- und Strukturanalyse

Es wurden folgende Programme benutzt:

BIOEDIT SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR 5.0.9 zum Vergleich von DNA- und Protein-Sequenzen.

DNA-STRIDER 1.3 (Douglas, 1995; Marck, 1988) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Vorbereitung von Klonierungsschritten.

Sequencher 4.0.5 zur primären Bearbeitung von DNA-Sequenzen.

CloneMap 2.11 zur Erstellung von Plasmidkarten und Restriktionskarten.

BLAST2 (Altschul *et al.*, 1990) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

RASMOL 2.6 (Sayle and Milner-White, 1995) zur Darstellung von dreidimensionalen Proteinstrukturen.

7.4. PCR-Techniken

7.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Innis *et al.*, 1990)

Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNA selektiv angereichert werden. Man benötigt hierzu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermo-block (Biometra) durchgeführt.

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt:

200 ng DNA

1 µl Primer 1 (25 pmol/µl)

1 µl Primer 2 (25 pmol/µl)

2 µl dNTPs (je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)

1 µl Taq DNA-Polymerase (1 U/µl)

4 µl 50 mM MgCl₂

10 µl 10× PCR-Puffer

in 100 µl H₂O_{bid}.

(überschichtet mit 50 µl Paraffin, falls Reaktion ohne Heizdeckel).

Die Reaktion lässt sich in drei Abschnitte unterteilen:

1 Zyklus **Denaturierung** bei 94°C 4 Minuten. Er dient zur vollständigen Denaturierung der Template DNA.

30 Zyklen **Amplifikation**. Ist wiederum in drei Phasen unterteilt: 1' Denaturierung bei 94°C, 2' Binden der Primer bei 55-62°C, 1' Polymerisation durch Taq bei 72°C.

1 Zyklus **Verlängerung** bei 72°C 8 Minuten ist nötig um nicht vollständig synthetisierte Fragmente zu komplettieren.

PCR-Puffer (*Pfu* DNA-Polymerase):

20 mM Tris-Cl, pH 8,8
10 mM KCl
10 mM (NH₄)₂SO₄
2 mM MgSO₄
1% (v/v) Triton X-100
1 mg/ml BSA
in H₂O_{bid.}

PCR-Puffer (*Taq* DNA-Polymerase):

10 mM Tris-Cl, pH 8,3
50 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
in H₂O_{bid.}

7.4.2. Vectorette-PCR

Mit dieser Methode (Dyer and Rosenberg, 1995; Hengen, 1995; Riley *et al.*, 1990) wurden die flankierenden Regionen der komplementierenden Cosmide aus *Ustilago* Zellen identifiziert, die mit der konventionellen Plasmid-Isolierungsmethode nicht isoliert werden konnten. Dazu wurde Gesamt-DNA von 1,5 ml der zu untersuchenden Stämmen (*don5* und *doll*) isoliert, die die komplementierenden Cosmide enthielt. Die Gesamt-DNA wurde mit *Pst*I verdaut, um die Ligation mit den *Pst*I-Überhang enthaltenden Vectorette Primer zu ermöglichen. Dadurch entstanden etwa 0,5 bis 1 kb große genomische Fragmente (**Abbildung 12, A**). Die Vectorette upper und lower (MB180 und MB181) Primerpaare wurden mit der T4 Polynukleotid Kinase (PNK) für 2 Stunden bei 37°C phosphoryliert und anschließend 10 min bei 65°C inaktiviert.

Ein typischer PNK Ansatz der Vectorette Primer enthielt:

6 µM Vectorette upper Primer
6 µM Vectorette lower Primer
17 mM ATP
20 U T4 PNK
10% T4 PNK-Puffer

Die phosphorylierten Vectorette Primerpaare wurden miteinander hybridisiert, indem sie nach 2minütiger Inkubation bei 65°C langsam (in etwa 20 min) in einem Heizblock auf 37°C abgekühlt wurden. Die upper und lower Primer enthielten eine nicht-komplementäre Region in ihrer zentralen Sequenz (**Abbildung 12**), wo sie nicht hybridisieren konnten und eine Blase bildeten. Die hybridisierten Vectorette Primer wurden an den beiden Enden der *Pst*I verdauten genomischen DNA ligiert (**Abbildung 12, B**). Dabei wurden auch die flankierenden Regionen des komplementierenden Cosmids mit Vectorette ligiert, die mit der konventionellen Methode nicht isoliert werden konnten. Der Ligationansatz wurde als Templat genommen für die PCR Reaktion mit dem Vectorette-spezifischen Primern (VP, MB182) und mit den T3 (MB184) bzw. T7 (MB183) Cosmid-spezifischen Primern. Der Vectorette-spezifische Primer bindet nur an den unteren Vectorette Strang und ist nicht mit dem oberen Strang skomplementär. So wurden in der PCR Reaktion gezielt nur Cosmid Randfragmente mit Vectorette-Linker amplifiziert, aber nicht genomische DNA Fragmente, die nur die Bindestelle für den Vectorette-spezifischen Primer, aber nicht für die Cosmid-spezifischen T3 und T7 Primer enthielten (**Abbildung 12, C**).

Ein typischer Vectorette PCR Ansatz enthielt:

Verdünnungsreihe von genomischer DNA

200 μ M dNTP Mix

1 μ M Cosmid-spezifischer Primer

1 μ M Vector-spezifischer Primer

2 mM $MgCl_2$

5 U Taq Polymerase

10x PCR Puffer

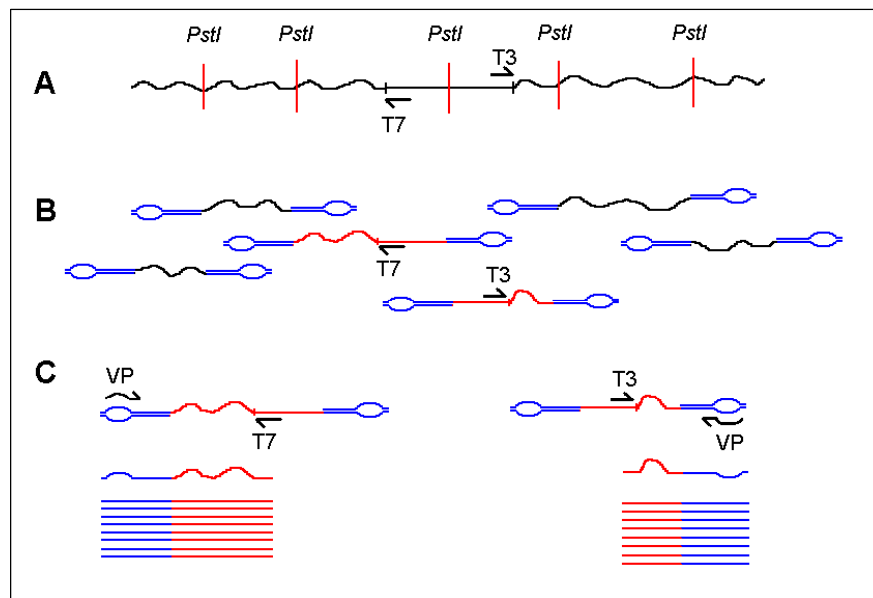
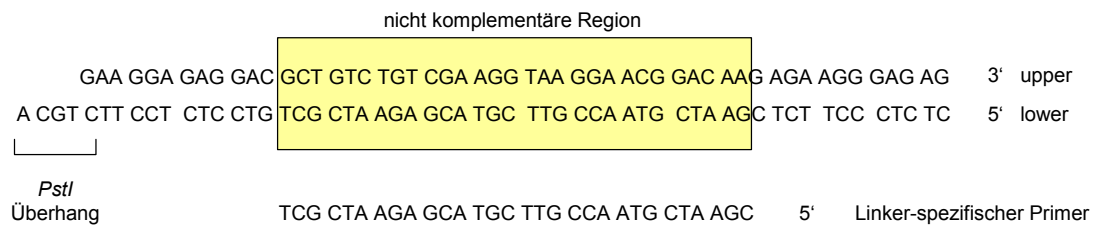


Abbildung 12: Klonierungsstrategie mittels Vektorette PCR. **schwarz:** genomische DNA, **blau:** hybridisierte Vektorette Linker mit einer nicht komplementären Base, **rot:** Sequenzen aus dem komplementierenden Cosmid, **VP:** Vektorette-spezifischer Primer

Die PCR Fragmente wurden in den pCR TOPO Vektor kloniert und sequenziert. Die Fragmente, die laut Sequenzanalyse Cosmid-Sequenzen an einer und Vektorette-Sequenzen an der anderen Seite aufwiesen, wurden ausgewählt und weiterverwendet.

Isolierung der flankierenden Sequenzen der komplementierenden Cosmide in *don5* und *dol1* mittels Vektorette PCR

Durch die Vektorette PCR Methode wurde in dem Falle der *don5* Mutante die isolierte genomische DNA mit *Nsi*I geschnitten und nach der PCR Reaktion mit den T7 Cosmid-spezifischen und Vektorette-spezifischen

Primer (MB182) wurde ein 0,5 kb Fragment isoliert. In dem Falle der *doll* Mutante wurde die isolierte genomische DNA mit *Pst*I oder mit *Nsi*I geschnitten und an die Vectorette Linker ligiert. Nach der PCR Reaktion mit dem T3 Cosmid-spezifischen und Vectorette-spezifischen Primer, bzw. mit dem T7 Cosmid-spezifischen und Vectorette-spezifischen Primer wurde ein 0,9 kb *Pst*I (T3 Seite) und ein 0,8 kb *Nsi*I (T7 Seite) Fragment isoliert, in pCR TOPO kloniert und die Klone wurden sequenziert.

Da die Ligation mit dem Vectorette Linker und die Amplifizierung der Konstrukte anfällig für Kontaminationen und Falschpaarungen waren, wurden Klone an einer Seite mit Cosmid-spezifischen, an der anderen Seite mit Vectorette-spezifischen Sequenzen gesucht.

Es wurden in allen drei Fällen richtige Klone gefunden (pTopo-*don5*-T7, pTopo-*doll*-T3, pTopo-*doll*-T7), die an ihren Flanken Cosmid- und Vectorette-Sequenzen trugen (das Beispiel von *doll* ist in der Abbildung 13 zu sehen). Das 0,5 kb *don5* Fragment und das 0,8 kb *doll* Fragment zeigten keine Homologien zu bekannten Sequenzen in der BLAST Suche. Das 0,9 kb *doll* (*Pst*I, T3) Fragment zeigte hohe Homologien zu Peroxin-1 (Pas1) in *P. pastoris* (4e-09) und in *S. cerevisiae* (2e-05).

Um weitere Cosmide für *don5* und *doll* zu finden, die die Mutation in diesen Mutanten komplementieren, wurden die 0,5 kb *don5*, 0,9 kb und 0,8 kb *doll* Fragmente aus den jeweiligen pTopo Plasmiden isoliert und als radioaktive Sonden für die Hybridisierung mit der geordneten *U. maydis* pScos UARS Cbx Cosmid-Bank verwendet. Es wurde in dem Falle von *don5* die 4E3, 4E7, 4A7, 4F7, 24H5, 18C6, 22B11, 35E3, mit der 0,9 kb *doll* Sonde (T3 Seite) die 1A4, 1A8, 26C2, 26G7, 26E9, 27A6, 27F3, 35A4 und mit der 0,8 kb *doll* Sonde (T7 Seite) das 29E2 Cosmid isoliert. Die Restriktionskartierung dieser Cosmide mit verschiedenen Enzymen ergab unterschiedliche Komplementationsgruppen. Aus jeder Gruppe wurde ein Cosmid für die Komplementation in *don5* oder *doll* Zellen transformiert und die Zellen wurden mikroskopisch auf Komplementation untersucht (Tabelle 6).

Tabelle 6: Isolierung überlappender Cosmide und Komplementationsversuche der *don5* und *doll* Mutanten.

	<i>don5</i>		<i>doll</i>	
	Cosmid	Komplementation	Cosmid	Komplementation
T3 Seite	nicht untersucht		1A4	–
			1A8	–
			26C2, 26G7	–
			26E9	–
			27A6, 27F3	–
			35A4	–
T7 Seite	4E3, 4E7, 4A7	–	29E2	–
	4F7	–		
	18C6	–		
	24H5	–		
	22B11	–		
	35E3	–		

Die untersuchten Cosmide komplementierten die *don5* oder *doll* Mutation nicht, daher wurde das Experiment aus Zeitgründen und wegen der Unsicherheit der Methode nicht weiter durchgeführt. Es ist vorstellbar, dass das

[illegible]

7.5. Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplicons

Pro Ansatz wurden 10 µl der Reaktion elektrophoretisch über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Gele enthielten 1% Agarose, der Gel- und Laufpuffer war 1x TAE, bei kleineren Fragmenten 1x TBE, mit 5 µg/ml Ethidiumbromid. Die Auftrennung erfolgte für 1,5 h bei 120 V bei RT. Die Gele wurden nach dem Lauf mit einer Geldokumentations-Anlage (Transilluminator TS-302, Spectrolin) unter UV-Licht analysiert.

7.6. Extraktion und Klonierung der Amplicons

Amplicons, die zwischen den zu vergleichenden Ansätzen ein differentielles Muster aufwiesen wurden unter UV-Durchlicht aus den Gelen ausgeschnitten, mit dem JETSORB® (Genomed) Kit eluiert und anschließend 4 µl der extrahierten DNA mit Hilfe des TOPO TA Klonierungs-Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR-Topo kloniert. Pro Amplicon wurden jeweils sechs Klone ausgewählt, präpariert und durch die Restriktion mit ampliconspezifischen Enzymen und Auftrennung über ein 2%iges Agarosegel konnten für jeden Klon ein spezifisches Bandenmuster erzielt werden.

7.7. *in vitro*-Modifikationen von DNA (Sambrook et al., 1989)

7.7.1. Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Ein analytischer Ansatz enthielt:

0,5 µg DNA
10 µg Rinderserum Albumin (BSA) (falls empfohlen)
1-2 U Restriktionsenzym
in 20 µl Restriktionspuffer

Nach Inkubation für 1 h bei 37°C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 2 µl nativer Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen analysiert.

7.7.2. Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen können mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten werden. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Religation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg Plasmid-DNA
1 U Alkalische Phosphatase (CIAP)
in 100 µl Alkalische-Phosphatase-Puffer

Nach Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase und einer Inkubation (30 min bei 37°C) wurde zur Inaktivierung des Enzyms eine Extraktion mit 100 µl Phenol durchgeführt. Die wässrige Phase wurde noch mal mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA wurde gefällt.

7.7.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in fünffach molarem Überschuß gegenüber der dephosphorylierten, linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

100 ng linearisierten, dephosphorylierten Vektor
fünffach molarer Überschuß an linearem Fragment
1 U T4 DNA-Ligase
2 µl Ligase-Puffer
in 20 ml H₂O

Der Ansatz wurde entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14°C inkubiert. Für Ligationen von nicht-überhängenden Enden wurde generell über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

7.8. Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

7.8.1. Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook et al., 1989). In der Regel wurden Gele mit 1% Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TAE- oder 1x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1x TAE- bzw. 1x TBE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 10:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (120 V). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (302 nm) mit einem Transilluminator TS-302 (Spectroline) detektiert und auf Thermalpapier photographisch dokumentiert werden.

7.8.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der JETSORB®-Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen freizuwaschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen die DNA von dieser Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 200 bp bis 5 kb aus Agarosegelen zu etwa 80-90 % isoliert werden.

7.9. Transfer von Nukleinsäuren

7.9.1. Spezifischer Nachweis von an Membranen gebundener DNA

Die Biotryne Membranen (Gibco) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte, radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10^6 cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Southern-Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten auf Kodak Film (Sigma) bei -80°C exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurde der Film entwickelt und die Signale wurden abgelesen.

7.9.2. Herstellung von Hybridisierungssonden

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem Megaprime Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech) unter Verwendung von $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP hergestellt. Das als Sonde vorgesehene denaturierte DNA-Fragment wird in einem Gemisch aus Hexanukleotiden zufälliger Sequenz ($(\text{d(N)}_6$) durch den Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP vom Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I radioaktiv markiert. Dazu wurden 100-500 ng DNA-Fragment mit 5 μl Primer in 34 μl H_2O für 5 min bei 95°C denaturiert. Der Reaktionsansatz enthielt:

34 μl denaturierte Fragment/Primer-Lösung

10 μl Reaction Buffer

5 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10 mCi/ml)

1 μl Klenow-Fragment (2 U/ μl)

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die nicht eingebauten Nukleotide über MobiSpin S-200 Säulen durch Zentrifugation abgetrennt. 1 μl des Eluats wurden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Probe in einem Szintillationszähler (Beckman) nach Cherenkov gemessen. Die Gesamtaktivität der Proben lag zwischen 5×10^6 und 2×10^7 cpm.

cla4:

1,6 kb *Hind*III Fragment aus dem komplementierenden pScos*Umcla4* Δ *Bam*HI Cosmid

Vectorette:

doll 0,9 kb PCR Fragment (als Insert auch in pCR TOPO ligiert: pTopo-*doll*-T3)

doll 0,8 kb PCR Fragment (als Insert auch in pCR TOPO ligiert: pTopo-*doll*-T7)

don5 0,5 kb Insert aus dem *Eco*RI Verdau von pTopo-*don5*-T7

V. ERGEBNISSE

8. Identifizierung weiterer Cytokinese-Mutanten

Um weitere Komponenten zu finden, die an der Don1/Don3 Kaskade beteiligt sind, sollten Mutanten isoliert werden, die einen ähnlichen Teilungsdefekt aufweisen wie die bereits bekannten *don1* und *don3* Mutanten. *don*-Mutanten sind anhand ihrer Kolonie-Morphologie auf 1% agarhaltigem PD Medium leicht zu erkennen (**Abbildung 14**). Während Wildtyp-Zellen glatte, runde Kolonien bilden, weisen *don*-Kolonien eine Kringel-ähnliche Morphologie auf, was das Auffinden solcher Mutanten nach einer UV-Mutagenese sehr erleichtert. *don*-Mutanten sind mikroskopisch daran zu erkennen, dass die Tochterzellen nach der Zellteilung nicht abgeschnürt werden und eine bäumchenartige Morphologie aufzeigen (**Abbildung 14**). Die Bildung dieser Zellcluster wurde ausgenutzt, um solche Mutanten durch Filtration anzureichern.

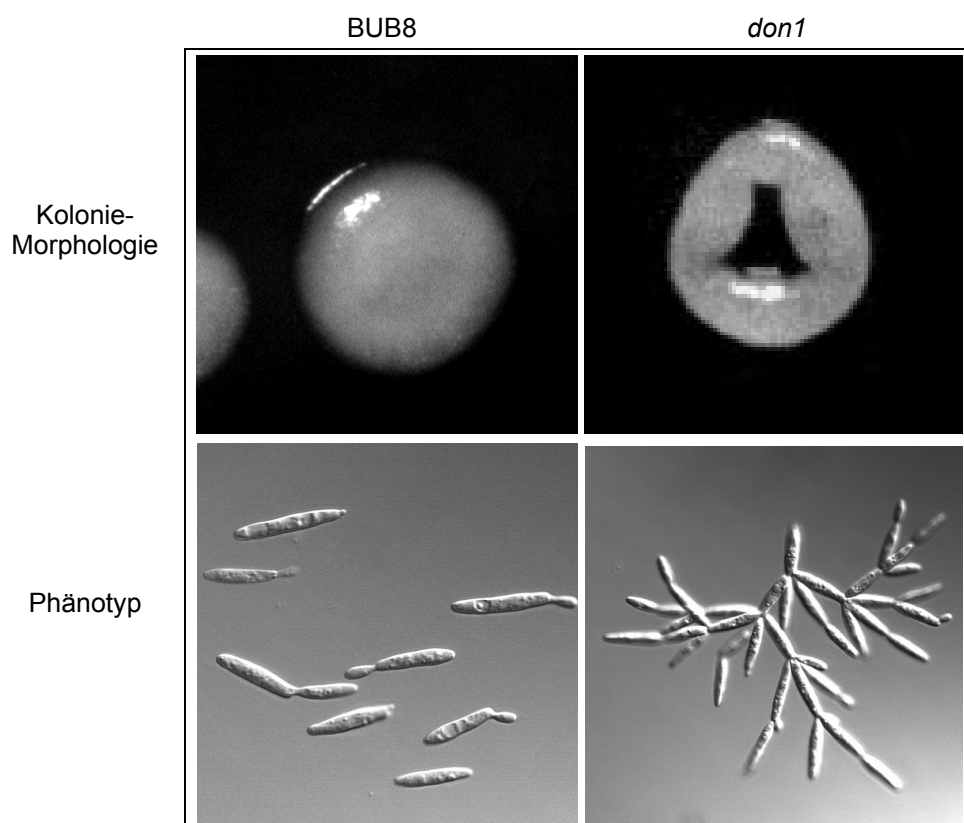


Abbildung 14: Morphologische Unterschiede der *don*-Mutanten vom Wildtyp. Wildtyp-Zellen (BUB8) und *don*-Mutanten (*don1* oder *don3*) sind anhand ihrer Kolonie-Morphologie auf 1% agarhaltigem PD Medium und ihrer Zellmorphologie leicht zu unterscheiden.

Die Mutagenese von Zellen des Wildtyp-Stammes BUB8 (*a2b4*) wurde bei 254 nm und einer Energie von 200 J/m² durchgeführt. Die bestrahlten Zellen wurden auf PD Platten, die 1% Agar enthielten, ausgebracht und nach 3 Tagen Inkubation bei 28°C ihre Kolonien-Morphologie untersucht. In mehreren Experimenten konnten insgesamt 57 Mutanten mit *don*-artigen Kolonien isoliert werden: 41 dieser Mutanten zeigten im Lichtmikroskop einen deutlichen bäumchenartigen Phänotyp und es wurden bei diesen Mutanten neben den Bäumchenstrukturen keine Einzelzellen gefunden. 16 Mutanten zeigten einen weniger ausgeprägten *don*-Phänotyp oder andere morphologische Veränderungen. In **Tabelle 7** sind die isolierten Mutanten aufgelistet und ihre Zellmorphologien kurz beschrieben.

Tabelle 7: Weitere *don*-ähnliche Mutanten.

Nr.	Phänotyp	Genotyp	Nr.	Phänotyp	Genotyp
LL751	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL780	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL752	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL781	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL753	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL782	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL754	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL783	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL755	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL784	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL756	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL785	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL757	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL786	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL758	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL787	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL759	<i>Don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL788	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL760	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL789	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL761	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL790	aus wenigen Zellen bestehende Ketten	?
LL762	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL791	lange Zellen mit kleinen Verzweigungen, auf PD wie weiße Schneeflocken	neu
LL763	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL792	dichte, kleine Kolonien	?
LL764	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL793	Ketten aus wenigen Zellen	neu
LL765	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL794	Zitronen-ähnliche Zellen	?
LL766	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL795	lange Zellen, lange Ketten mit Verzweigungen	neu
LL767	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL796	eher unregelmäßiges Netz bäumchenartiger Zellen	<i>don4</i>
LL768	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL799	Chlamydosporen ähnlich, sehr krank	?
LL769	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL800	kürzere, aus ein paar Zellen bestehende Ketten, auch größere Bäumchen	<i>don5</i>
LL770	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL803	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>
LL771	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL804	Chlamydosporen-ähnlich, sehr krank	?
LL772	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL805	sehr krank	?
LL773	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL806	dickes, <i>don</i> -ähnliches Netz mit Propeller-Strukturen	<i>doll</i>
LL774	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL808	kürzere, dickere Ketten mit kurzen Verzweigungen	neu
LL775	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL809	dicke, zusammenbleibende krumme Ketten, mit gelblichen Verfärbungen	<i>cla4</i>
LL776	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL813	<i>don</i> -Morphologie	<i>don6</i>
LL777	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL816	<i>don</i> -ähnlich, sehr krank	neu
LL778	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>	LL817	<i>don</i> -ähnlich, sehr krank	neu
LL779	<i>don</i> -Morphologie	<i>don1</i>			

8.1. Komplementationstest mit *don1* und *don3*

Bei den Mutanten, die einen ausgesprochen *don*-ähnlichen Phänotyp zeigten, musste zuerst untersucht werden, ob sie allelisch zu *don1* oder *don3* sind. Dazu wurde eine Komplementationsanalyse dieser neu isolierten morphologischen Mutanten mit *don1*⁻ und *don3*⁻ Stämmen durchgeführt. Die Mutanten wurden mit kompatiblen *don1*- bzw. *don3*-Zellen gemischt und in Maispflanzen inokuliert. Nach der Bildung der Gallen wurden die isolierten diploiden Teliosporen auf Wasseragar-Platten ausplattiert. Auf diesen Platten bildeten sich nach der Meiose Mikrokolonien, die etwa 50-200 haploide Zellen enthielten. Zur Vereinzelung der Nachkommen wurden diese auf 1% agarhaltigen PD-Platten wieder vereinzelt. Anschließend wurde untersucht, ob sich unter den Nachkommen solche befinden, die wieder einen Wildtyp-Phänotyp aufweisen. Nach den Mendelschen-Regeln ergibt die Kreuzung von Mutanten, die in zwei ungekoppelten Genen mutiert sind, eine Segregation der Gene, die in 25% Wildtyp, 25% erste Mutante, 25% zweite Mutante, 25% Doppelmutante Phänotypen aufweist, während die Nachkommen von Mutanten, die im gleichen Gen betroffen sind, in der Regel zu 100% den mutierten Phänotyp zeigen. Mit Hilfe dieser Methode ließ sich feststellen, dass 40 der 57 neu gefundenen Mutanten mit dem *don1*-Gen allelisch waren, keine Mutante im *don3*-Gen betroffen war und 11 Mutanten in verschiedenen Genen mutiert waren. 6 neue Mutanten wurden nicht weiter untersucht, weil ihr Phänotyp nicht eindeutig war.

9. Beschreibung der neuen morphologischen Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die morphologischen Mutanten *don4*, *don5*, *doll* (*don*-like 1), *cla4* und *don6* näher charakterisiert, da sie einen deutlichen und stabilen Phänotyp zeigten. Außerdem konnte in der Komplementationsanalyse gezeigt werden, dass diese Mutanten jeweils auf der Mutation eines einzelnen Gens beruhen.

9.1. Phänotyp der *don*-ähnlichen Mutanten

Alle Mutanten bildeten auf Festmedien mehr oder weniger *don*-ähnliche Kolonien, die in ihrer Mitte ein Loch formen (**Abbildung 17**). Sie bildeten in Flüssigmedium Schneeflocken-ähnliche Aggregate, ähnlich zu *don1* und *don3*, was auf die zusammenhängende bäumchenartige Morphologie der Zellen zurückzuführen ist. Die Zellen wurden nach Anfärbung der Zellkerne mit SYTO 11 mit einem Leica Konfokalen Mikroskop

mikroskopisch untersucht und visualisiert. Da die Mutanten in den meisten Fällen große Aggregate bildeten, die ein unübersichtliches Bild ergeben hätten, wurden kleinere Bäumchen gesucht, um den Mutanten-Phänotyp besser präsentieren zu können. Alle Mutanten enthielten einen Zellkern pro Zelle bei der permissiven Temperatur (**Abbildung 18**), die *cla4* Mutante zeigte jedoch Kernteilungsdefekt bei 34°C (siehe Kapitel 19.5).

Die *don4* und *don5* Mutanten zeigten im Vergleich eine sehr ähnliche Morphologie, da in Flüssigkulturen auch Einzelzellen und kleine Bäumchen zu finden waren. Dies weist darauf hin, dass die Cytokinese in diesen Zellen nicht komplett blockiert war. Die abgetrennten Zellen wuchsen aber mit einem deutlichen Zelltrennungsdefekt weiter und bildeten wiederum bäumchenartige Strukturen (**Abbildung 16, A, B**). In den *don4* und *don5* Mutanten kann in einigen Fällen eine deutliche, dem Wildtyp ähnliche Fragmentierungszone beobachtet werden (**Abbildung 15**). Daher ist es wahrscheinlich, dass einige Zellen ein sekundäres Septum bilden können und fähig sind, die Zelltrennung abzuschließen. Die Tochterzellen werden in den *don4* und *don5* Mutanten jeweils nur am neuen Ende gebildet, wie in den *don1* und *don3* Mutanten.

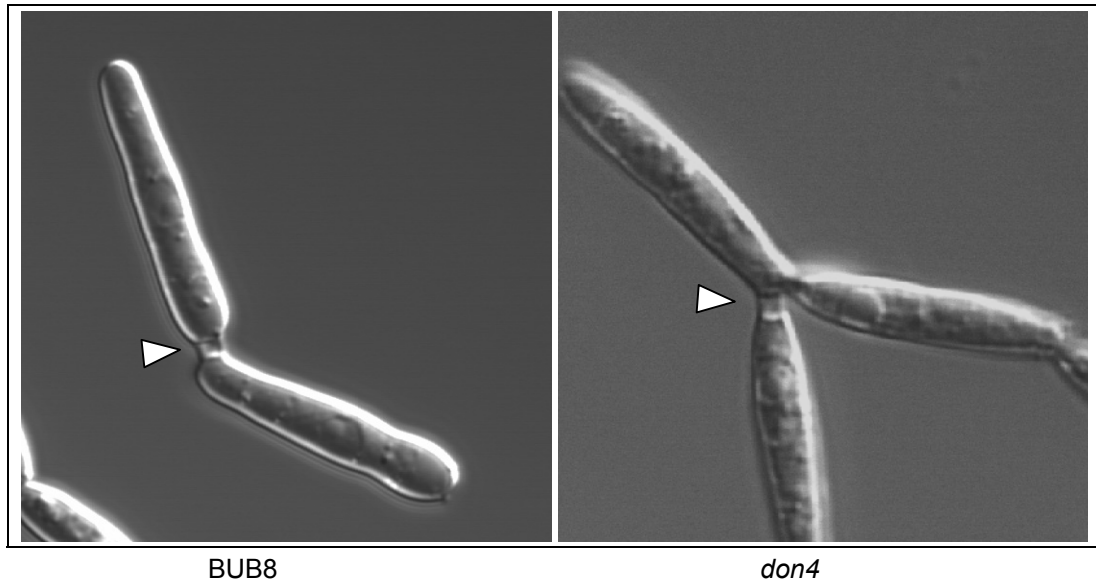


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme der Septierungsregion in Wildtypzellen und in der *don4* Mutante. Das weiße Dreieck zeigt die Fragmentierungszone, begrenzt durch das primäre und sekundäre Septum.

Da die *don4* und *don5* Mutanten einen sehr ähnlichen Phänotyp aufwiesen, bestand die Möglichkeit, dass sie in demselben Gen mutiert waren. Um dies zu überprüfen, wurde eine

Komplementationsanalyse durch Kreuzung kompatibler *don4* und *don5* Zellen durchgeführt. Der Phänotyp der Nachkommen wurde mikroskopisch untersucht und es wurden außer Zellen mit *don*-Morphologie auch Wildtyp-Zellen gefunden, was zeigt, dass die *don4* und *don5* Mutanten nicht allelisch sind, sondern in verschiedenen Genen mutiert sind. Ein besonderer Phänotyp eventueller Doppelmutanten konnte nicht von dem der Ausgangsmutanten unterschieden werden.

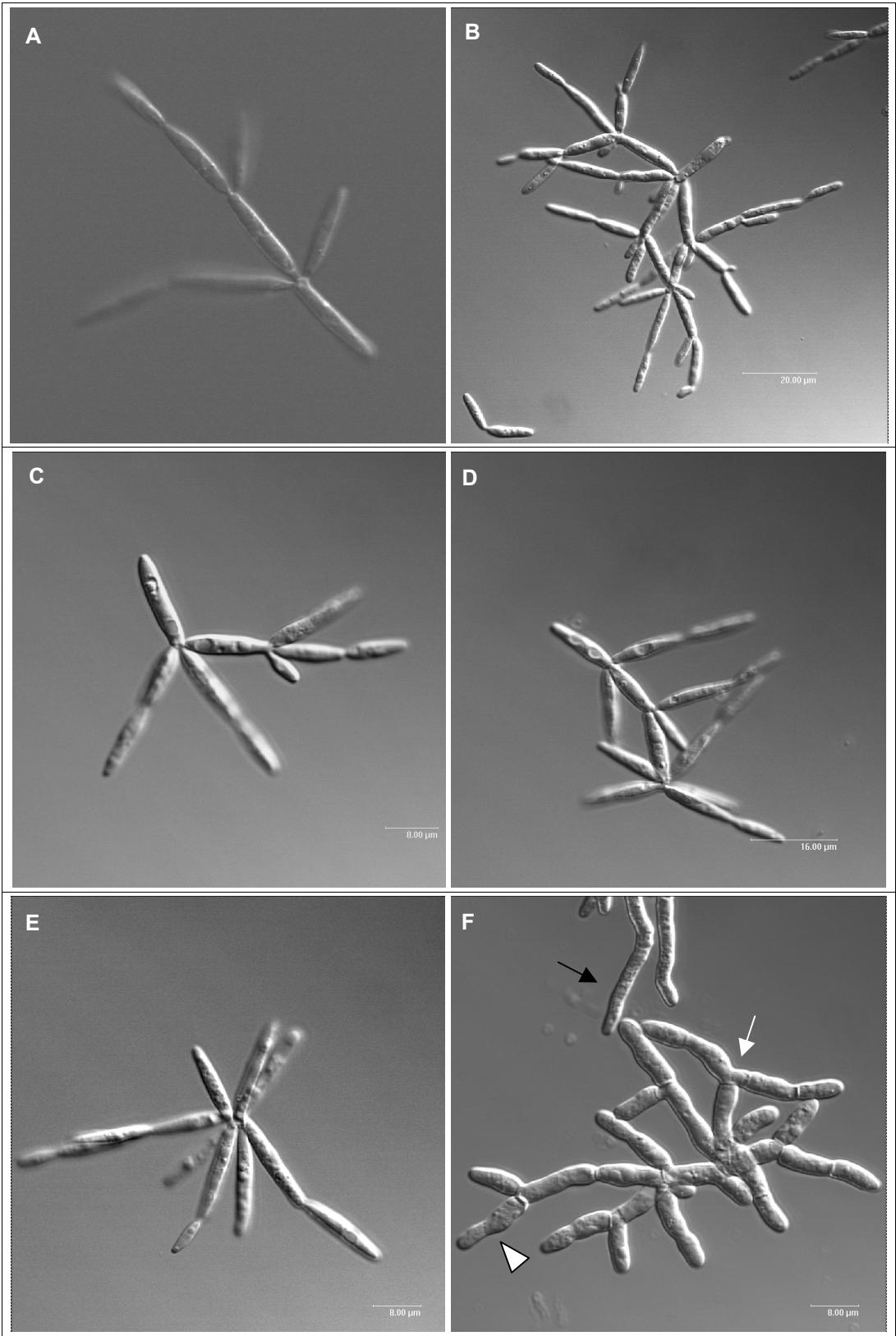
Die *don6* Mutante bildet in Flüssigkulturen ungewöhnlich große flache oder Schneeflocken-ähnliche Aggregate und die Zellen formen in diesem Fall große *don*-ähnliche Bäumchenstrukturen. Unter bis jetzt unbestimmten Bedingungen sehen die Strukturen eher netzartig aus, da die Mutterzellen auch an ihren alten Enden knospen und dadurch aus mehreren Zellen bestehende Propeller- oder Sternchen-ähnliche Strukturen gebildet werden (**Abbildung 16, C**). In seltenen Fällen können auch Einzelzellen beobachtet werden.

doll-Zellen bilden ebenfalls Propeller-artige Strukturen, die mit aus wenigen Zellen bestehenden netzartigen Ketten zusammengebunden sind (**Abbildung 16, D**). Untersuchungen zeigen, dass solche Strukturen auch in der Abwesenheit der regulatorischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Kinase entstehen (Mayorga and Gold, 2001). Es können in der *doll*-Mutante fast ausschließlich nur diese Strukturen und nur vernachlässigbar wenige Einzelzellen beobachtet werden, die wahrscheinlich von den größeren Bäumchen abbrechen. An diesen kleineren Strukturen kann man gut beobachten, dass die Zellen an ihren alten Enden ihre Tochterzellen bilden.

Die *cla4* Mutante unterscheidet sich von den *don*-Mutanten in ihrer Zellmorphologie, ihre Zellen sind dicker, wachsen krumm und sie bilden zusammenhängende, sehr dichte und große Aggregate in Flüssigkulturen (**Abbildung 16, E**). In einem Struktur kann nur schwer bestimmt werden, welche die ursprüngliche Mutterzelle ist, da die Zellen die Polarität verlierend an ihren beiden Enden oder an ihren Seiten in alle Richtungen Tochterzellen bilden können, die in einigen Fällen sehr lang wachsen, ohne Septen zu bilden (**Abbildung 16, E**). Die Zellen scheinen keine richtigen Knospen zu bilden, sie verdoppeln sich in der Länge in der ganzen Zellenbreite, und dann wird die Zelle etwa in der Mitte, an der Stelle der Septumbildung, leicht eingeschnürt, letztendlich wird hier ein Septum eingezogen. Dieser Vorgang erinnert eher an die Septierung in der Spaltehefe, *S. pombe* als an die in Wildtyp-Zellen von *U. maydis*, obwohl *U. maydis* Zellen ähnliche Strukturen bilden können, wenn sie

aus der stationären G_0 -Phase wieder in den Zellzyklus treten und ihr erstes Septum bilden. Es ist aber auch zu bemerken, dass einige Zellen, die an der Seiten ihre Tochterzellen bilden, doch Knospen zu formen scheinen und auch abgeschnürt werden. In lichtmikroskopischen Aufnahmen ist immer nur ein Septum zwischen den Zellen zu finden, obwohl die Septen in vielen Fällen nur sehr schwer zu entdecken sind, wahrscheinlich wegen der ungewöhnlich dicken Zellwand. Die richtige Antwort auf die Struktur der Septen konnte nur Chitinfärbung und EM-Analyse geben (siehe **Abbildung 21** und Kapitel 19.1). In wenigen Fällen können auch krumm wachsende Einzelzellen beobachtet werden, was darauf hinweist, dass einige Zellen sich eventuell abtrennen können, aber mit dem gleichen Zellteilungsdefekt weiterwachsen.

Abbildung 16: Verschiedene Phänotypen der don-Mutanten. (folgende Seite)
(A) Bäumchenbildung in den *don4* und *don5* Mutanten (B) Bäumchenbildung in der *don5* Mutante (C-D) Bäumchenbildung in der *don6* Mutante (E) Sternchenbildung und Verzweigungen in der *doll* Mutante. (F) Zellmorphologie der *cla4* Mutante. Bevor das Septum geformt wird, ist eine schwache Einschnürung zu sehen (weißes Dreieck); Einige Zellen werden auch ohne Septum verlängert (schwarzer Pfeil); die Zellen können auf dem falschen Pol in die entgegengesetzte Richtung wachsen, manche Zellen werden von beiden Seiten durch Septa abgetrennt (weißer Pfeil). *cla4* Zellen bilden auch ungewöhnlich große Aggregate in Flüssigkulturen.



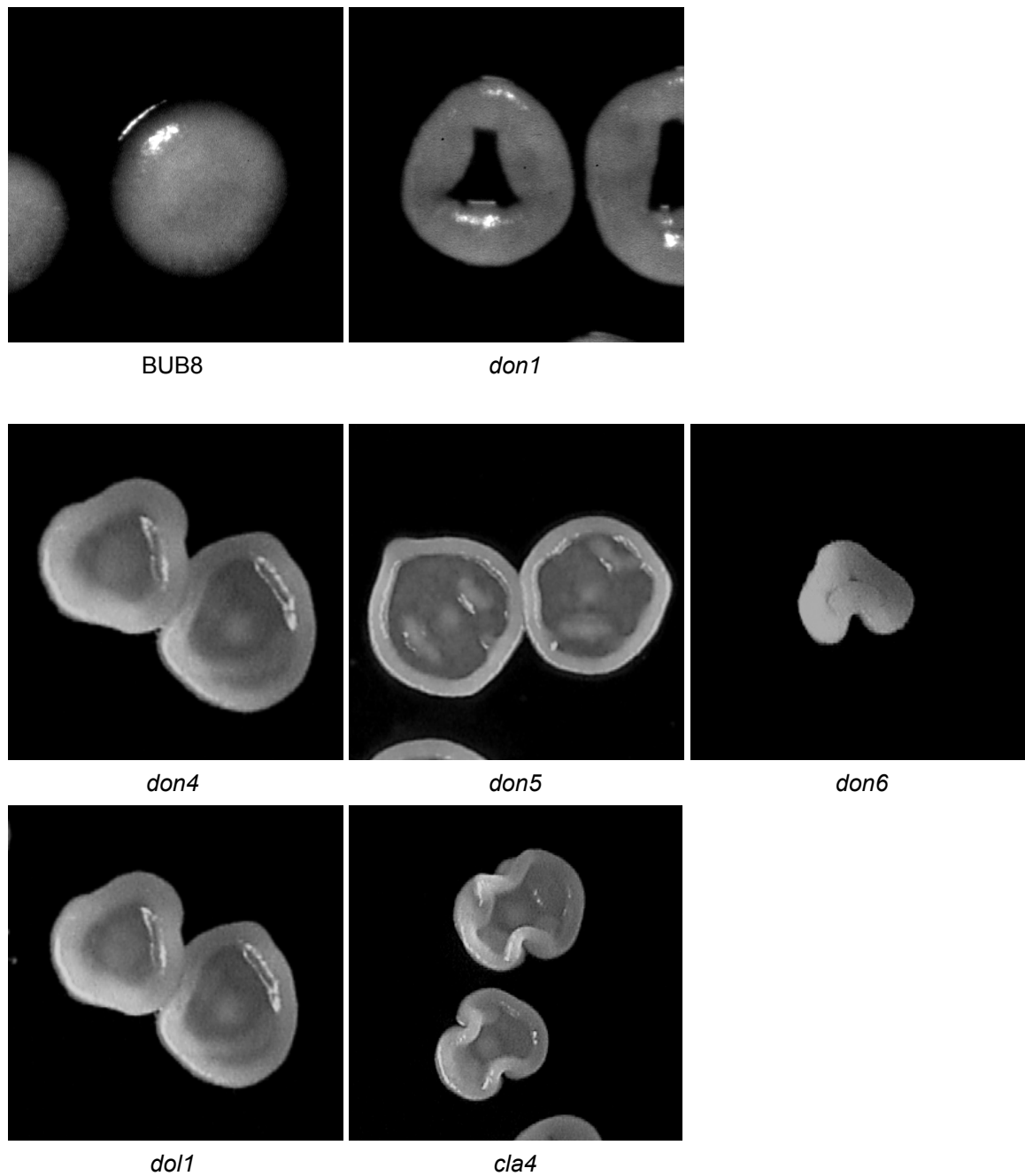


Abbildung 17: Koloniemorphologie der neuen morphologischen Mutanten. Alle untersuchten Mutanten zeigen *don*-ähnliche Kolonie-Morphologie, die in ihrer Mitte ein Loch formen. Der Wildtyp-Stamm (BUB8) bildet im Gegensatz dazu glatte, runde Kolonien.

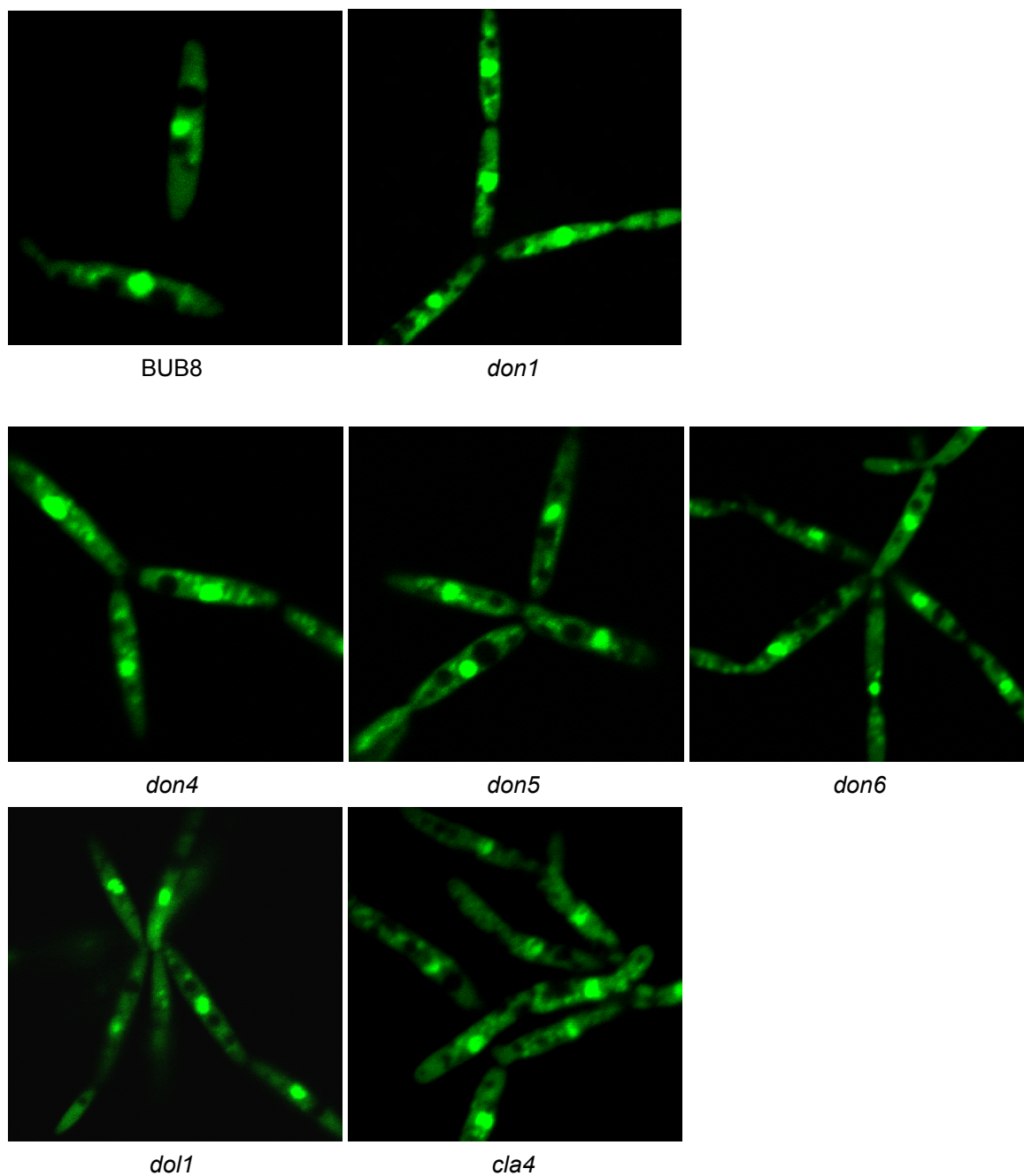


Abbildung 18: Kernlokalisierung in den neuen morphologischen Mutanten. Alle untersuchten Mutanten enthalten einen Zellkern pro Zelle bei der permissiven Temperatur. Die Zellen wurden mit SYTO 11 gefärbt und mit einem Leica Konfokalen Mikroskop mikroskopiert.

10. Septenbildung in den Mutanten

Da die Zellen der *don*-ähnlichen Mutanten von einander nicht separiert werden können, bleiben sie zusammen und bilden bäumchenartige Strukturen. Welcher Schritt der Zelltrennung gestört ist – die Bildung des primären oder sekundären Septums oder der Fragmentierungszone – kann zum Teil durch einfache lichtmikroskopische Untersuchungen bestimmt werden. Ob es sich bei diesen Strukturen tatsächlich um eine Akkumulation von Membranstrukturen an der Stelle der Fragmentierungszone und um ein primäres und sekundäres Septum handelt, wurde durch Zellwandfärbungen und Expression eines FYVE-Zn-Finger-GFP-Proteins untersucht.

Die Zellwand von *U. maydis* besteht unter anderem aus Chitin, das mit dem Chitinfarbstoff, Calcofluor White (Mitchison and Nurse, 1985), oder mit dem zu den Lektinen gehörenden Weizenkeim-Agglutinin (WGA Alexa Fluor oder Oregon Green, Wheat Germ Agglutinin, (Nagata and Burger, 1974)) sichtbar gemacht werden kann. WGA erkennt spezifische Konfigurationen von Polysacchariden an den Stellen des aktiven Wachstums. In Wildtyp-Zellen können die beiden an der Zellteilung beteiligten Septen durch Anfärbung mit WGA Alexa Fluor sichtbar gemacht werden (**Abbildung 19**). Durch Auswertung mit Hilfe der Leica TCS SP2 Konfokalen Mikroskop Software werden sie etwa in einer Entfernung von 0,5 bis 1 μm voneinander gebildet.

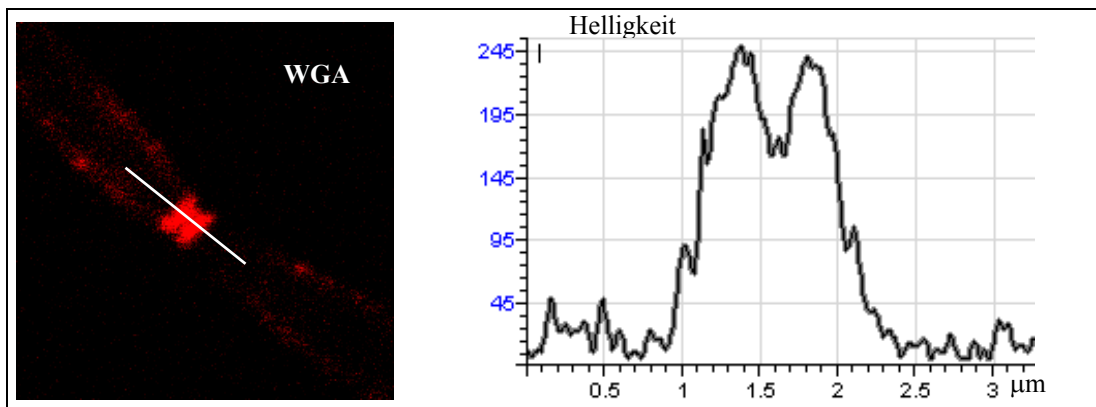


Abbildung 19: Chitinfärbung mit WGA in Wildtyp-Zellen. Der in der Aufnahme markierte Bereich wurde mit der Leica TCS SP2 Software analysiert und rechts im Diagramm wird die Helligkeit über den Verlauf der Strecke dargestellt: Die beiden Peaks entsprechen den Septen auf der mikroskopischen Aufnahme, die sich etwa 0,5 μm voneinander entfernt befinden.

Um die Anzahl der gebildeten Septa in den *don*-Mutanten zu bestimmen, wurden Übernachtkulturen der Zellen in frisches Medium überimpft und nach 4 Stunden mit WGA und Calcofluor gefärbt und mikroskopisch untersucht.

Mit den WGA und Calcofluor Farbstoffen konnte gezeigt werden, dass die zusammenhängenden Zellen der *don4* und *don5* Mutanten in der Regel durch ein einzelnes Septum verbunden sind. Allerdings war zwischen einigen Zellen auch ein sekundäres Septum zu erkennen (**Abbildung 20**, **Abbildung 21**), wie dies anhand der DIC-Aufnahmen bereits vermutet wurde (**Abbildung 15**). Dies weist darauf hin, dass in diesen Zellen die Cytokinese stark verlangsamt abläuft. Damit kann auch die Beobachtung von Einzelzellen erklärt werden, die in geringer Anzahl in Flüssigmedium zu finden sind.

In Wildtyp-Zellen wurden mit beiden Chitin Farbstoffen deutlich die wachsenden Spitzen der Zellen und die Septen gefärbt, wobei mit Calcofluor White auch die Zellwand angefärbt wurde (**Abbildung 20**). Bei allen *don*-Mutanten fällt auf, dass WGA die ganze Zellwand viel stärker färbte, als in Wildtyp-Zellen. Besonders in der *cla4* Mutante ist eine starke Färbung der Zellwand über die gesamte Länge der Zelle zu beobachten. Dies weist auf einen Defekt in der gerichteten Ablagerung von Zellwandmaterial hin. Außer bei der *cla4* Mutante konnten in den anderen Mutanten nicht nur die Zellwände und Zellenspitzen, sondern auch die Septen mit WGA gefärbt werden, die Stellen der Septumbildung waren in diesen Mutanten jedoch viel schmaler als in *cla4* Zellen. In den *don6*, *doll* und *cla4* Mutanten wiesen beide Chitinfärbungen auf ein einzelnes Septum hin (**Abbildung 20**, **Abbildung 21**).

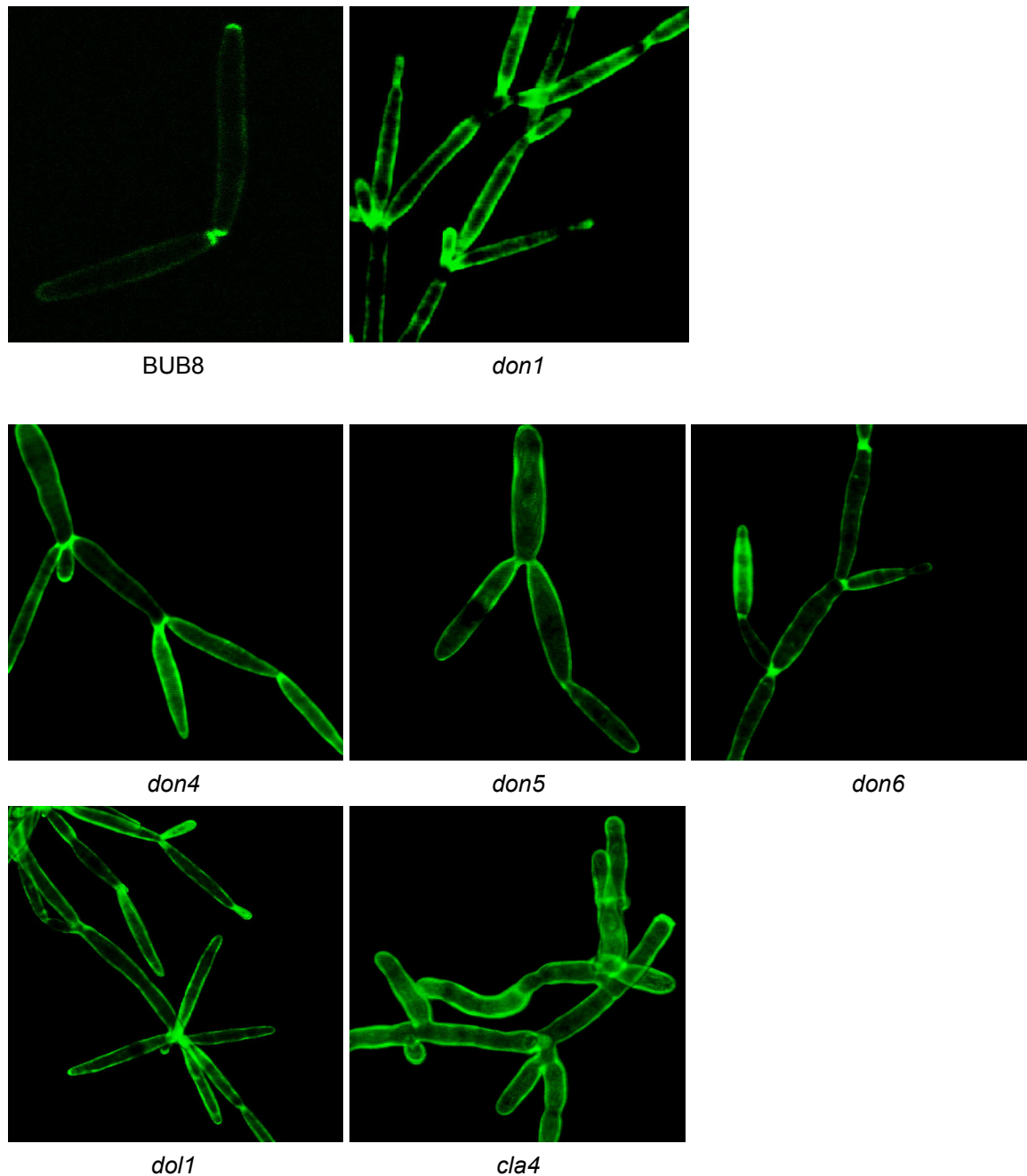


Abbildung 20: Chitinfärbung der *don*-Mutanten mit dem WGA Farbstoff. Die Mutanten wurden mit dem WGA Oregon Green Farbstoff gefärbt und auf die Anzahl der Septen untersucht. Auffällig ist, dass alle *don*-Mutanten eine verdickte Zellwand hatten, die mit WGA stark zu färben war. Es ist am deutlichsten in dem Falle der *cla4* Mutante zu beobachten, deren Septen jedoch mit diesem Farbstoff gar nicht zu färben waren. Die *don1*, *don3* (nicht gezeigt), *don6*, *dol1* und *cla4* Mutanten enthielten in jedem Fall nur ein Septum, die *don4* und *don5* Mutanten bildeten in einigen Fällen auch dem Wildtyp ähnliche Doppelsepten.

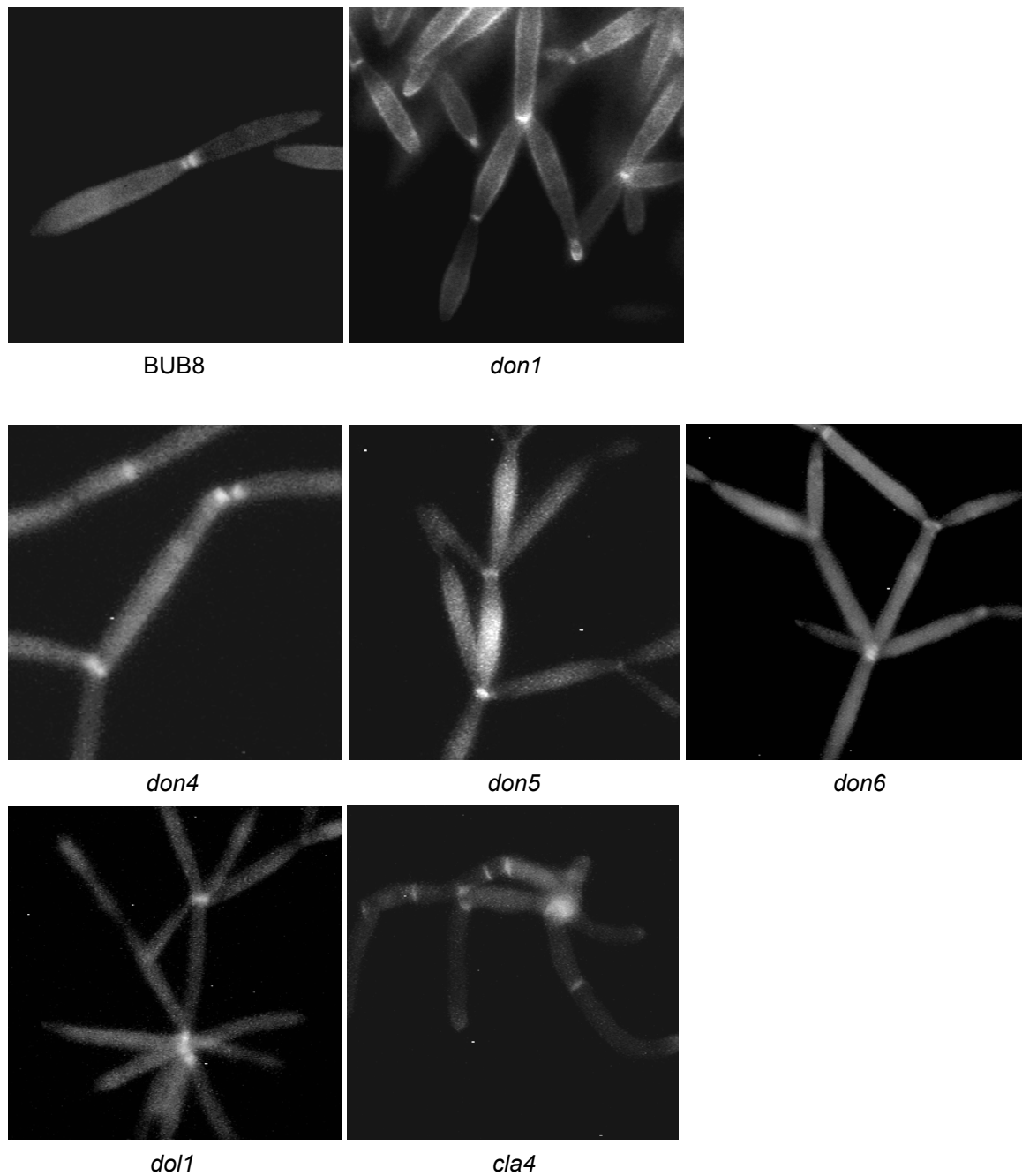


Abbildung 21: Chitinfärbung der *don*-Mutanten mit Calcofluor White. Die Mutanten wurden mit dem Calcofluor White Farbstoff gefärbt und auf die Anzahl der Septen untersucht. Die Färbung mit den WGA und Calcofluor White Farbstoffen ergab ein unterschiedliches Fluoreszenzmuster, was auf die unterschiedlichen Targets dieser Farbstoffe zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz zu der WGA Färbung konnten die Septen in der *cla4* Mutante mit Calcofluor White gefärbt werden.

11. Die Akkumulation von Endosomen am primären Septum spielt eine Rolle in der Septierung

Intrazelluläre Membranen lassen sich mikroskopisch durch Anfärbung mit spezifischen Farbstoffen unterscheiden. Ob die Fragmentierungszone durch die Akkumulation von Vakuolen oder anderen Membranstrukturen aufgebaut wird, wurde in Wildtyp-Zellen und in den *don*-Mutanten durch die Verwendung des FM4-64 Farbstoffes geprüft, der für Endosomen- und Vakuolen-Membranen spezifisch ist (Vida and Emr, 1995). Dazu wurde zu frischen Flüssigkulturen der Zellen in einer Endkonzentration von 40 mM FM4-64 gegeben, die Zellen wurden 15 Minuten lang weitergeschüttelt, schließlich kurz pelletiert und mikroskopisch untersucht. In dieser Zeit wird der Farbstoff in die Membran endocytotischer Vesikel aufgenommen und zu den Vakuolen geleitet. Die gewählte Zeit machte es möglich, dass gleichzeitig auch Endosomen und schon gefärbte Vakuolen zu sehen waren. In sich teilenden Zellen mit kleinen und mittleren Knospen war die Verteilung der Endosomen und Vakuolen ähnlich wie es in Wedlich-Söldner *et al.* (2000) für haploide Zellen beschrieben wurde. Zellen, die eine größere Knospe hatten und das primäre Septum schon bildeten, zeigten punktartige rote Färbung an der Tochterseite des Septums, die nicht an kleine kreisförmige Vakuolen erinnerten, sondern an Endosomen-ähnliche kleine dichte Punkte (**Abbildung 22**, BUB8, Pfeil). Die Beobachtung, dass diese Strukturen an der Mutterseite des Septums nie beobachtet werden konnten und sie mit der Fragmentierungszone an der Tochterseite überlappten, lässt vermuten, dass die während der Septierung gebildete Fragmentierungszone durch die Akkumulation von frühen- oder späten-Endosomen entstanden sein könnte. In den *don1* und *don3* Mutanten konnten eine dauerhafte Akkumulation derartiger Strukturen an der Tochterseite des primären Septum mit FM4-64 Färbung gezeigt werden. Es ist naheliegend, dass die Endosomen-Akkumulation den Membranstapeln entspricht, die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von den *don1* und *don3* Mutanten beobachtet werden konnten (Weinzierl *et al.*, 2002).

Um zu untersuchen, ob die neu isolierten *don*-ähnlichen Mutanten zur Bildung solcher Endosomen-Akkumulationen fähig sind, wurde mit FM4-64 eine Färbung der Endosomen und Vakuolen vorgenommen (**Abbildung 22**). In den *don4* und *don5* Mutanten, bei denen auch in der WGA Färbung und in DIC-Aufnahmen eine Fragmentierungszone zu erkennen war, konnten Endosomen-artige Strukturen an der Tochterseite des primären Septums mit FM4-64 Färbung beobachtet werden.

Die *don6* Mutante, die kein sekundäres Septum bilden kann, akkumulierte interessanterweise keine Endosomen an dem primären Septum, was darauf hindeuten kann, dass das betroffene Protein eventuell in einer Signalkaskade vor der Akkumulation der Membranstrukturen eine Rolle spielt, oder die Mutante in der Lokalisierung dieser Vesikel gestört sein könnte (**Abbildung 22**). Die *doll* und *cla4* Mutanten zeigten keine richtige *don*-Morphologie und die FM4-64 Färbung deutete darauf, dass sie auch keine Fragmentierungszone bilden, bzw. keine endosomale Membranstrukturen am Septum akkumulieren (**Abbildung 22**).

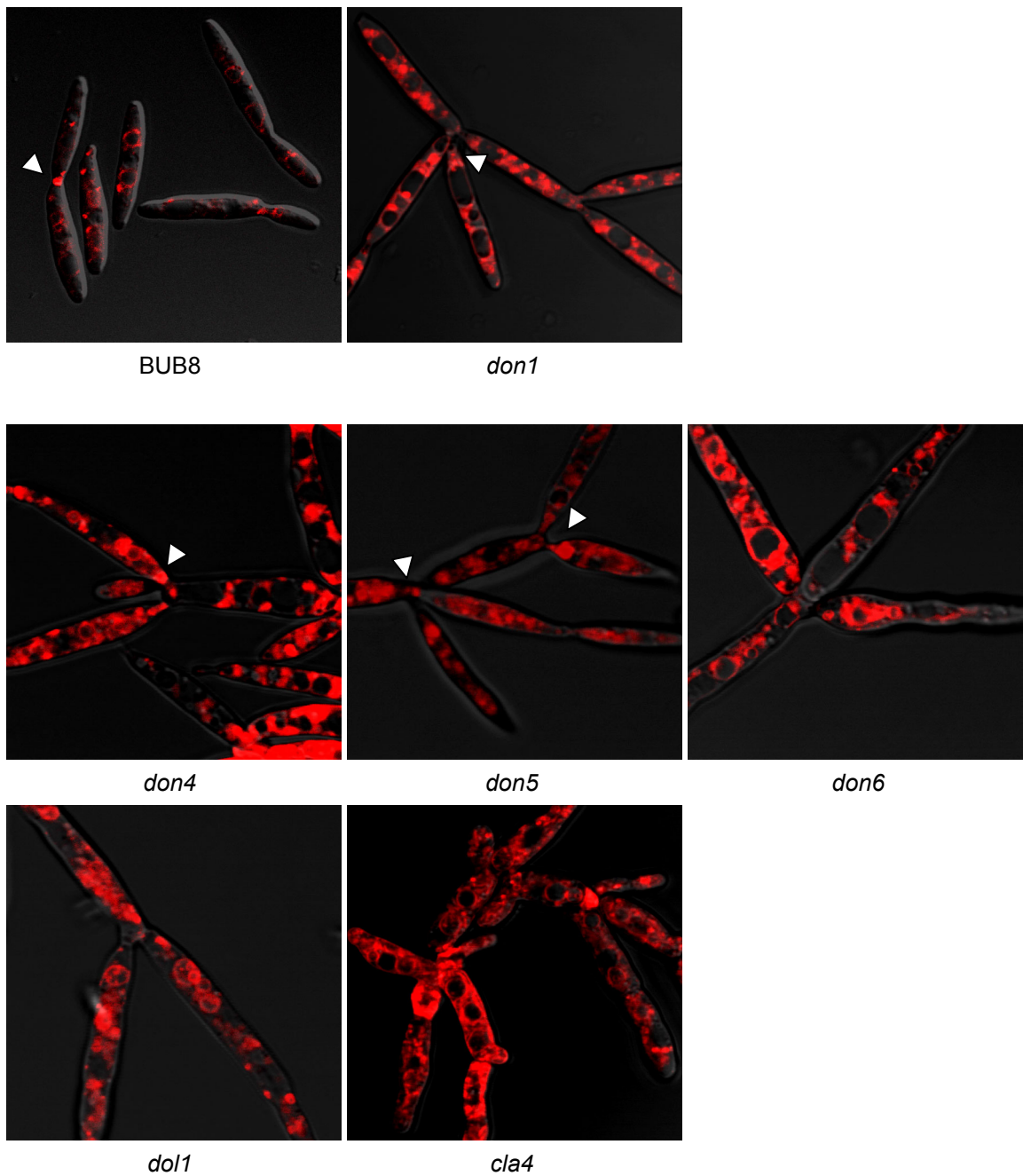


Abbildung 22: FM4-64 Färbung für Endocytose in den *don*-Mutanten. Die Zellen wurden mit dem Endocytose-Farbstoff FM4-64 15 min gefärbt. Diese Zeit machte es möglich, gleichzeitig Endosomen und schon gefärbte Vakuolen zu sehen. Die Pfeile zeigen die Akkumulationen von Endosomen an den Septen in den Tochterzellen in Wildtyp-Zellen, in der *don1*, *don4*, *don5* Mutante (*don3* ist nicht gezeigt).

11.1. Lokalisierung der Don1 FYVE Zn-Finger Domäne in *U. maydis*

Das Don1 Protein verfügt über eine charakteristische FYVE Zn-Finger Domäne. Für dieses konserviertes Proteinmotiv konnte in verschiedenen Organismen gezeigt werden, dass sie für eine Membranassoziation durch Bindung an Phosphatidylinositol-3-monophosphat (PI(3)P) verantwortlich ist. Da sich PI(3)P hauptsächlich an Endosomen- und Vakuolen-Membranen befindet, deutet dies auf eine Lokalisierung der FYVE Zn-Finger Proteine im endocytotischen Membran-Transport (Stenmark *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde auch vermutet, dass Don1 ebenfalls an frühen- oder späten-Endosomen lokalisiert und möglicherweise eine Funktion bei der Bildung der Fragmentierungszone spielt. Um mehr über die Funktion des Don1 Proteins bei der Akkumulation von Membranstrukturen am primären Septum in Wildtyp-Zellen und in den *don*-Mutanten zu erfahren, wurden mikroskopische Untersuchungen nach der Transformation eines FYVE Zn-Finger-GFP Konstruktes durchgeführt.

Dieses Konstrukt wurde bereits von H. Hudel hergestellt, wo die Don1 FYVE Zn-Finger Domäne hinter den etef-Promotor gesetzt und C-terminal mit dem *egfp* Gen fusioniert wurde (p123*don1*Zn-FingerGFP). In Wildtyp-Zellen wurde der GFP-Signal in kleinen beweglichen Vesikeln und an Vakuolen-Membranen beobachtet. In dieser Arbeit wurde versucht nachzuweisen, ob das FYVE Zn-Finger-GFP mit den FM4-64 gefärbten inneren Membranen kolokalisiert, um herauszufinden, um welche Membranstrukturen es sich bei dem GFP-Signal genau handelt. Dazu wurden BUB8 Wildtyp-Zellen mit dem p123*don1*Zn-FingerGFP Konstrukt transformiert und die GFP-exprimierende Zellen wurden 15 Minuten lang mit dem FM4-64 Farbstoff gefärbt und mikroskopiert. Nach dieser Zeit wurden nicht nur Endosomen, sondern auch Vakuolen mit diesem Farbstoff gefärbt. Die Lokalisierung der FYVE Zn-Finger Domäne wurde außer in haploiden Zellen auch in sich teilenden Zellen untersucht.

Wie **Abbildung 23** zeigt, kolokalisiert das GFP-Signal mit der FM4-64 Färbung. Die Doppelfärbung zeigte, dass die Lokalisation der Don1 FYVE Zn-Finger Domäne mit diesen Organellen in der ganzen Zelle übereinstimmt (**Abbildung 23, A**, in der Überlagerung gelb). In sich teilenden Zellen wurde das GFP-Signal zusammen mit der FM4-64 Färbung außerdem auch im Septierungsbereich, an der Stelle der Fragmentierungszone akkumuliert, gefunden. Dies weist darauf hin, dass bevor das sekundäre Septum gebildet wird, an der Tochter-Seite Endosomen, die die Don1 FYVE Zn-Finger Domäne an sich gebunden halten, zum primären Septum transportiert werden.

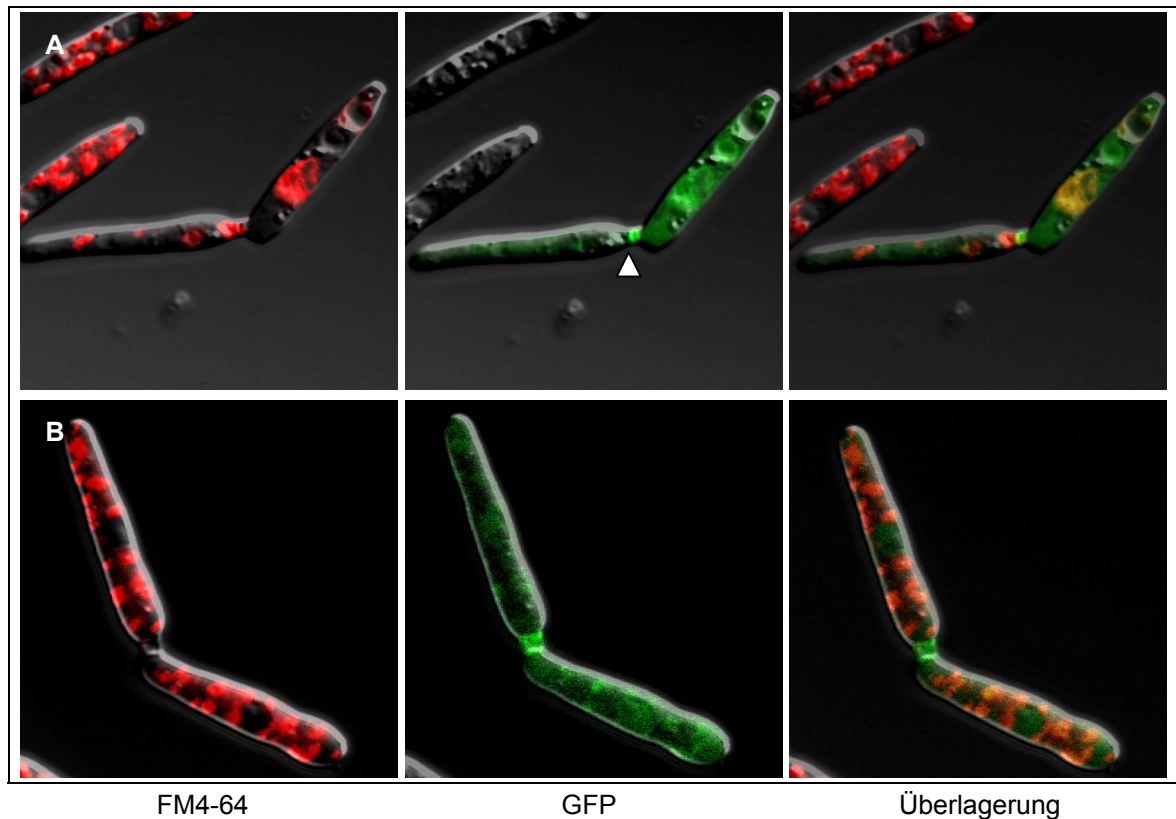


Abbildung 23: Lokalisierung der Don1 FYVE Finger Domäne in Wildtyp-Zellen. Die FYVE Zn-Finger-GFP Fusionsprotein exprimierenden Zellen (BUB8) wurden mit FM4-64 gefärbt, um eine mögliche Kolokalisierung zu untersuchen. **(A)** Wildtyp-Zelle vor der Bildung des sekundären Septums **(B)** Wildtyp-Zelle nach der Bildung des sekundären Septums. Bevor das sekundäre Septum gebildet wird, werden an der Tochter-Seite Endosomen zum Septum transportiert (weißer Pfeil). Die neu gefärbten Endosomen fusionieren in der Zelle mit Vakuolen und die Doppelfärbung zeigt, dass die Lokalisation der Don1 FYVE Zn-Finger Domäne (grün) mit diesen Organellen übereinstimmt (im überlappenden Bild gelb). Die neu synthetisierten Don1 FYVE Zn-Finger Domänen werden in der Fragmentierungszone akkumuliert, wo sie mit Endosomen kolokalisieren.

Das FYVE Zn-Finger-GFP Konstrukt wurde in *don3*, *don4*, *don5* und *cla4* Zellen transformiert und die Zellen wurden mikroskopiert. Wie in *don1* Zellen konnte das GFP-Signal auch in *don3* Zellen an Endosomen- und Vakuolen-Membranen und auch am primären Septum an der Tochterseite gefunden werden, was auf eine normale Lokalisierung hinweist (**Abbildung 24**). In der *cla4* Mutante war die Lokalisierung ebenfalls dem Wildtyp ähnlich, das GFP-Signal wies jedoch an dem unregelmäßigen Septum keine besondere Akkumulation auf, was zeigt, dass die Fragmentierungszone in dieser Mutante nicht gebildet wird, worauf schon die FM4-64 Färbung hindeutete. In den *don4* und *don5* Mutanten wurde eine interessante Misslokalisierung der FYVE Zn-Finger Domäne beobachtet: In beiden Fällen wurde das GFP-Signal an einzelnen Flecken in den Zellen gefunden, die jedoch keine Vakuolen waren sondern an Zellkern-ähnliche Strukturen erinnerten. Das GFP-Signal füllte

die ganze Struktur aus und befand sich nicht nur an den äußeren Membranen, außerdem lokalisierte die *don5* Mutante die FYVE Domäne diffus in der ganzen Zelle. Die Misslokalisierung des Don1 Proteins könnte möglicherweise für den Septierungsdefekt der *don4* und *don5* Mutanten verantwortlich sein (**Abbildung 24**).

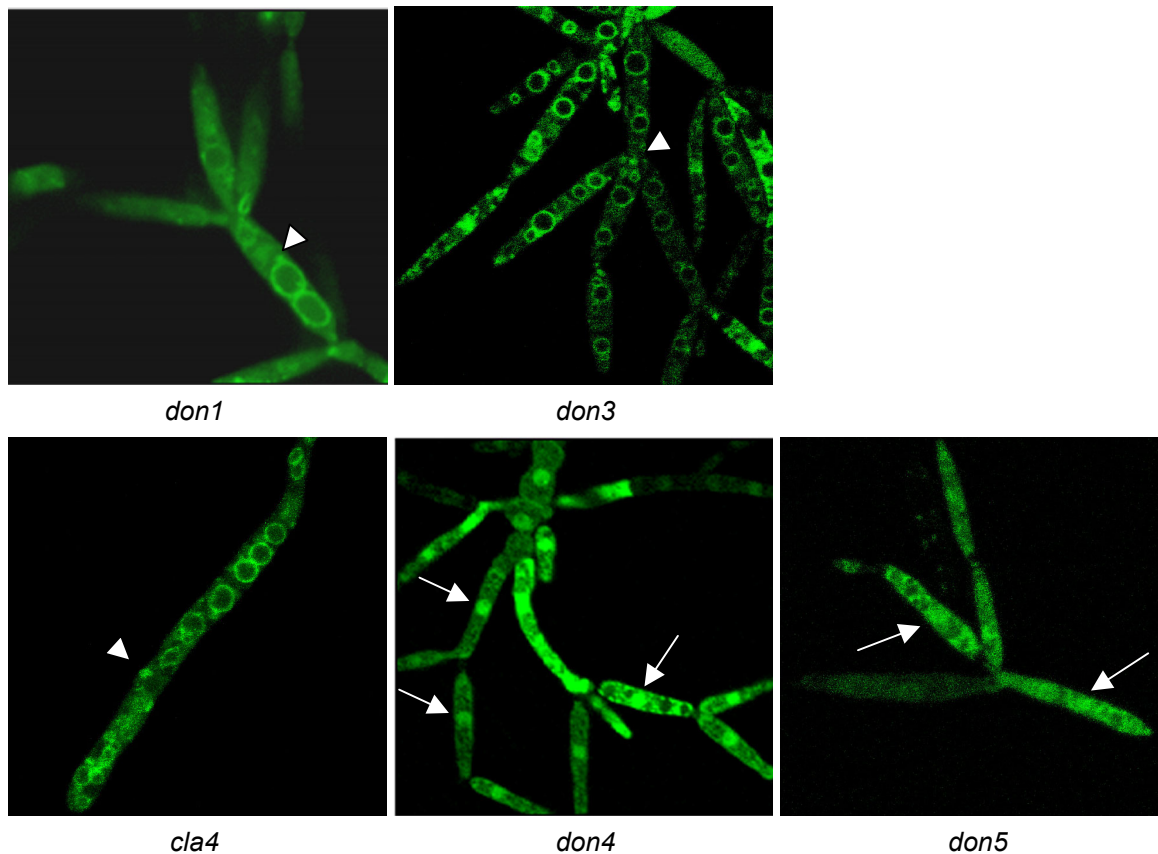


Abbildung 24: Lokalisierung der Don1 FYVE Zn-Finger Domäne in den *don1*, *don3*, *don4*, *don5* und *cla4* Zellen. Die Lokalisierung der FYVE Zn-Finger Domäne ist in den *don1* (Aufnahme von H. Hudel), *don3* und *cla4* Mutanten der von Wildtyp-Zellen ähnlich: Die Domäne ist an Endosomen und Vakuolen Membranen zu sehen. Sie wird jedoch in der *cla4* Mutante an dem unregelmäßigen Septum nicht akkumuliert gefunden, was zeigt, dass die Fragmentierungszone in dieser Mutante gar nicht gebildet wird. In den *don4* und *don5* Mutanten kann eine Misslokalisierung der FYVE Zn-Finger Domäne beobachtet werden: In beiden Fällen wurde das GFP-Signal im Zellkern und diffus in der ganzen Zelle gefunden. Die Pfeilspitzen zeigen Endosomen, die normalen Pfeile die Lokalisierung der FYVE Domäne in den Zellkernen.

12. Septine, cytoskeletale Polymere in der Cytokinese

Da in der Bäckerhefe Septine eine wichtige Rolle während der Cytokinese spielen, wurde untersucht, ob in den Mutanten die Lokalisierung eines in *U. maydis* bekannten Septins gestört ist. Das Gen für das Septin Cdc10 wurde von J. Tyczka und H. Hudel in unserer Arbeitsgruppe kloniert. Außerdem lag bereits ein N-terminales Cdc10-GFP Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des konstitutiven etef-Promotors vor (J. Hahn, unveröffentlicht).

12.1. Lokalisierung des Cdc10 Septin Homologes in *U. maydis* Wildtyp-Zellen

Das Cdc10 Fusionskonstrukt wurde in die morphologischen Mutanten und in BUB8 Wildtyp-Zellen transformiert und mikroskopisch untersucht (**Abbildung 25**).

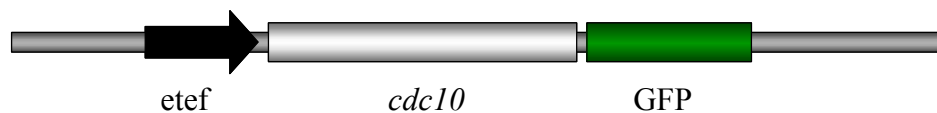


Abbildung 25: Konstrukt für das Cdc10-GFP Fusionsprotein. Das *U. maydis* *cdc10* Gen wurde hinter das konstitutiv aktive etef-Promotor gesetzt und C-Terminal mit *egfp* fusioniert.

Um die Lokalisierung des Cdc10-GFP Proteins besser zuordnen zu können, wurde die Zellwand und die Septen außerdem mit dem Chitin-Farbstoff, WGA Alexa Fluor gefärbt (**Abbildung 26**). Im Gegensatz zu Hefezellen, konnten in *U. maydis* Zellen keine Septin Ringe an den vorherigen Knospungsstellen beobachtet werden. Die Expression des Septin-GFP Proteins führt zur Anfärbung von langgezogenen Strukturen, die eventuell Cytoskelett-Elemente sein könnten und bei dem Transport der Septine zur zukünftigen Knospungsstelle eine Rolle spielen könnten (**Abbildung 26, A**). In knospenden Zellen erscheint das Cdc10-GFP Signal am Hals zwischen der Mutter- und Tochterzelle in einer ringförmigen Struktur unter dem Kortex (**Abbildung 26, B-C**), die sich während der Septierung verdoppelt anschließend an beiden Seiten des primären Septums aufhält (**Abbildung 26, D**). Nach der Zelltrennung verschwinden die Septine vom Hals der Knospen und bevor die neue Knospe an der gegenüberliegenden Seite gebildet wird, wird das Cdc10-GFP vermutlich an die neue Knospungsstelle transportiert (**Abbildung 26, E**).

Untersuchungen in der Hefe zeigten, dass die Organisation des Septin-Ringes die kleine GTPase Cdc42p benötigt (Cid *et al.*, 2001; Pringle *et al.*, 1995), die sich kortikal an der Stelle der zukünftigen Knospe während der späten G₁-Phase befindet (Gulli *et al.*, 2000; Pringle *et al.*, 1995; Ziman *et al.*, 1993). Cdc42 ist nicht nur für die Bildung des Septin-Ringes notwendig, sondern auch für die Polarisierung des Aktin-Cytoskeletts obwohl diese unabhängige Ereignisse sind (Ayscough *et al.*, 1997; Pringle *et al.*, 1995).

Da die Don1 und Don3 Proteine an der Cdc42 Signalisierungskaskade beteiligt sind, die zu Septumbildung und damit zu Cytokinese führt, war es interessant herauszufinden, ob die Septine in dieser Kaskade als downstream Regulatoren beteiligt sein können oder in einem unabhängigen Prozess reguliert werden, wie es in der Hefe für die Cdc42-Cla4 Kaskade gezeigt wurde (Richman *et al.*, 1999). Außerdem wurde überprüft, ob die neuen *don*-ähnlichen Mutanten in der Septin-Lokalisierung Abnormalitäten aufweisen.

In *don1* und *don3* Zellen konnte ein ähnliches filamentöses Septin wie in Wildtyp-Zellen an der Spitze der jüngeren Knospen beobachtet werden und die Lokalisierung von Cdc10 zwischen Mutter- und Tochterzellen war auch normal: Ein einzelner Septin Ring war zwischen den Zellen zu sehen, entweder an der Mutter- oder an der Tochterseite, es konnten aber nie zwei Septin-Ringe beobachtet werden (**Abbildung 27**). Interessanterweise blieb der Septin Ring an der Teilungsebene auch in älteren Zellen vorhanden und verschwand nicht wie in Wildtyp-Zellen. Dies könnte auf den Defekt der Bildung des sekundären Septums und der damit verbundenen Unvollständigkeit der Cytokinese zurückzuführen sein. Auch die *don6* Mutante wies eine normale Cdc10 Lokalisierung an der Spitze der wachsenden Knospen und in der Septierungsregion auf, der allein stehende Septin-Ring wurde auch in älteren Zellen erhalten (**Abbildung 28**).

Abbildung 26: Septin Lokalisierung während der Zellteilung in *U. maydis*. (folgende Seite)

Das Cdc10-GFP Konstrukt wurde in BUB8 Zellen transformiert und die Lokalisierung des Septins wurde mittels einem Konfokalen Mikroskops untersucht. Die Chitin-Lokalisierung in der Zellwand und in den Septen wurde mit WGA Färbung visualisiert. **(A)** In haploiden Zellen wurden Septine an die Stelle der zukünftigen Knospe transportiert und blieben bis zur Septumbildung in einer ringförmigen Struktur unter der Zellwand **(B-C)**. Chitin Färbung mit WGA im primären Septum zeigte, dass der Septin-Ring zum Zeitpunkt der Septumbildung in zwei geteilt wurde und an beiden Seiten, in der Mutter- und in der Tochterzelle, zu sehen war **(D)**. Nach der Zelltrennung wurden Septine vom alten Ende zum neuen Ende transportiert, wo die nächste Knospe gebildet wurde **(E)**.

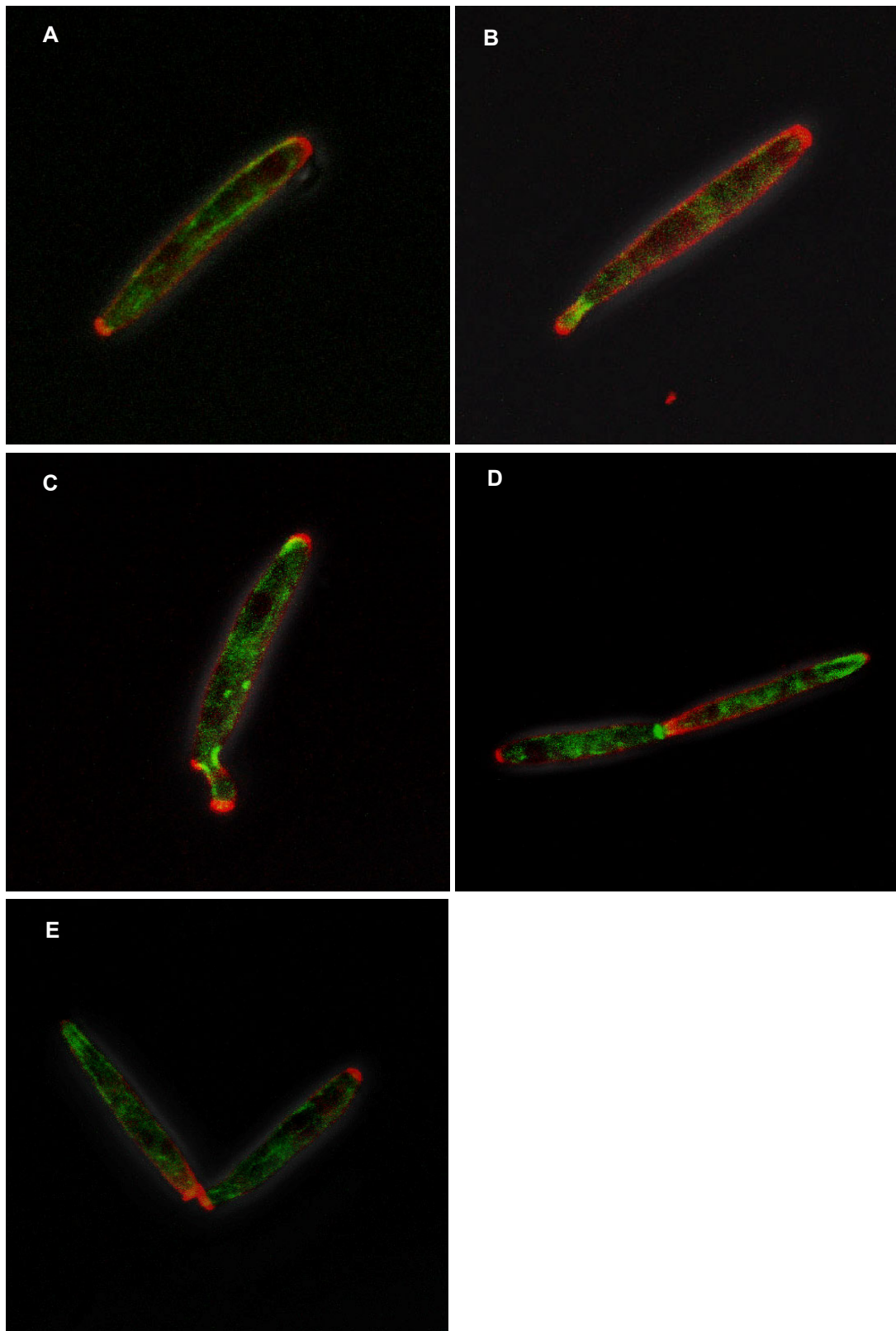




Abbildung 27: Septin Lokalisierung in den *don1*- und *don3*-Mutanten. Das Cdc10-GFP Konstrukt wurde in *don1* und *don3* Zellen transformiert (**grün**), Chitin wurde in den Septen und an den neuwachsenden Spitzen mit WGA Alexa Fluor gefärbt (**rot**). Beide Mutanten zeigten eine normale Lokalisierung des Cdc10 Proteins an der Stelle der Knospenbildung, zwischen Mutter- und Tochterzellen. Ein einzelner Septin Ring war auch zwischen älteren Zellen zu sehen, entweder an der Mutter- oder an der Tochterseite.

In der *don5* Mutante zeigten die Zellen zwar in einigen Fällen Septin-Ring-ähnliche Strukturen zwischen Mutter- und Tochterzelle, manche aber wiesen auch an ihren Seiten delokalisierte Septin-„patches“ auf, was darauf hindeutet, dass eventuell die Transport-Maschinerie der Septine in diesen Zellen gestört sein könnte oder andere Faktoren fehlen könnten, die in der richtigen Positionierung eine wichtige Rolle spielen würden (**Abbildung 28**).

Es wurde versucht, das Cdc10-GFP Konstrukte auch in *cla4* Zellen einzubringen, dies gelang trotz vielfacher Wiederholung nicht, obwohl dieses Konstrukt ohne Schwierigkeit in andere Zellen eingebracht werden konnte und auch *cla4* Zellen sich mit anderen Plasmiden transformieren ließen. Dies könnte auf eine Interaktion der Cla4 und Cdc10 Proteine hindeuten, in der die Mutation des Cla4 Proteins zusammen mit der Überexpression des Cdc10 Proteins synthetische Letalität verursachen würde.

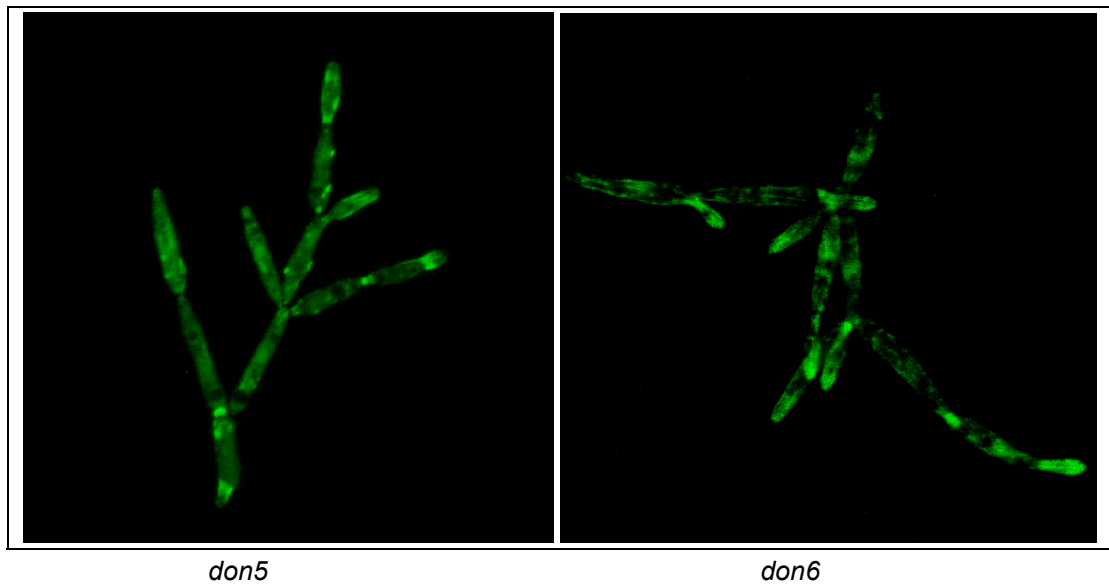


Abbildung 28: Septin Lokalisierung in den *don5* und *don6* Mutanten. Die *don6* Mutante wies normale Cdc10 Lokalisierung auf, an der Spitze der wachsenden Knospen und in der Septierungsregion war das GFP Signal des Septins zu sehen. In der *don5* Mutante war die Septin-Lokalisierung abnormal, die Zellen enthielten zwar in einigen Fällen Septin-Ring-ähnliche Strukturen zwischen Mutter- und Tochterzelle, zeigten aber auch an ihren Seiten delokalisierte Septin-„patches“.

12.2. In den neu isolierten Mutanten ist die Cytokinese an unterschiedlichen Punkten blockiert

Zusammenfassend kann man auf Grund der bisher gezeigten Daten sagen, dass die *don4*, *don5* und *don6* Mutanten Defekte in verschiedenen Stadien der Cytokinese zeigen (Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22).

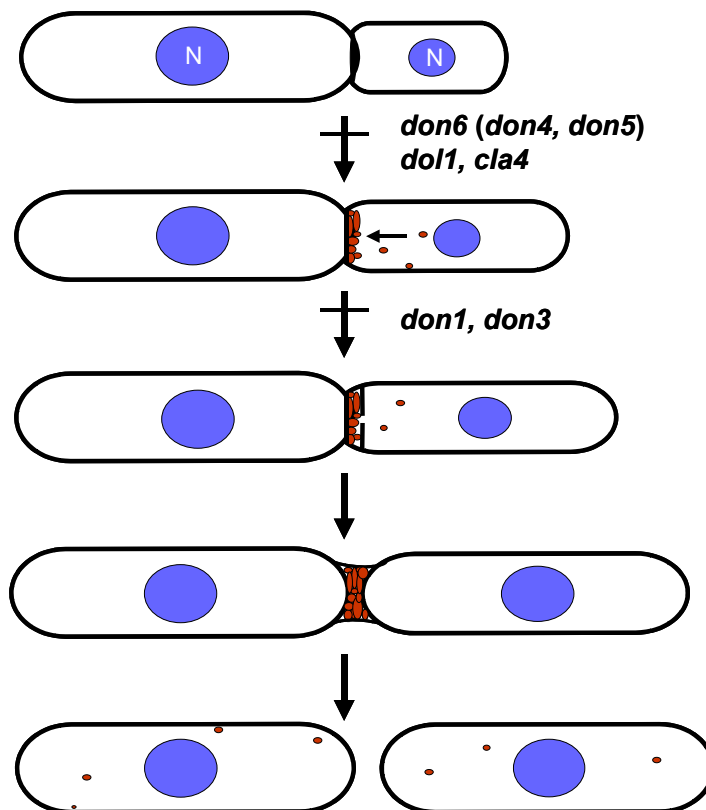


Abbildung 29: Die neuen Cytokinese Mutanten sind bei verschiedenen Stadien der Septierung beschädigt. Anhand der WGA und FM4-64 Färbungen kann bestimmt werden, in welchem Stadium der Cytokinese die *don*-Mutanten beschädigt sind: die *don6* Mutante bildet nur ein primäres Septum und ist nicht fähig, Endosomen an diesem Septum zu akkumulieren. Die *don4* und *don5* Mutanten bilden in einigen Fällen hinter der Fragmentierungszone auch ein sekundäres Septum und sind fähig, die Cytokinese durchzuführen. (**blau:** Nukleus; **rot:** Endosomen)

Die *don6* Mutante bildet in jedem Fall nur ein primäres Septum und ist nicht fähig, Membranstrukturen an dem Septum zu akkumulieren. Die *don4* und *don5* Mutanten sind fähig in einigen Fällen die Septierung und die Cytokinese durchzuführen, indem sie das primäre und sekundäre Septum bilden und zwischen den beiden eine Fragmentierungszone formen. Die *cla4* und *dol1* Mutanten bilden zwar auch nur ein Septum, aufgrund ihrer

unterschiedlichen Morphologie können sie nur schwer in die Don1/Cdc42/Don3 Kaskade eingeordnet werden. Die *don1*, *don3* und *don6* Gene scheinen für die Bildung des Septin-Ringes in der Septumregion zwischen Mutter- und Tochterzelle nicht essentiell zu sein, während *don5* und wahrscheinlich auch *cla4* für die Lokalisierung der Septine benötigt werden (**Abbildung 29**).

13. Epistasis-Analyse der neuen Cytokinese-Mutanten

Um herauszufinden, ob die neu isolierten Cytokinese-Mutanten in der Don1/Don3 Signalisierungskaskade eine Rolle spielen und wenn ja, ob sie oberhalb oder unterhalb von Cdc42 wirken, wurden die Mutanten mit einer konstitutiv aktiven Variante von Cdc42 transformiert. Sind die Mutanten in einem Gen mutiert, das in der Kaskade vor *cdc42* aktiv ist, sollte der Phänotyp der Mutante durch die Induktion der konstitutiv aktiven Variante von Cdc42 gerettet werden können. Gleichzeitig konnte damit ein weiterer unabhängiger Hinweis für die Beteiligung von Cdc42 an diesem Signalweg erbracht werden.

Konstitutiv aktives Cdc42 stellt den Wildtyp-Phänotyp von *don1*-Zellen, aber nicht den von *don3*-Zellen wieder her

Die Proteine Don1 und Don3 sind Mitglieder einer Signaltransduktions-Kaskade, die für die Bildung des sekundären Septums während der Zellteilung verantwortlich sind. Sequenzvergleiche wiesen darauf hin, dass das Don1 Protein ein Regulator (GEF) und Don3 ein Effektor für kleine GTPasen der Rho/Rac-Familie ist. Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems konnte eine spezifische Bindung von Don1 und Don3 nur mit Cdc42 nachgewiesen werden (Weinzierl *et al.*, 2002). Um die Vermutung zu bestätigen, dass Cdc42 an diesem Signalweg beteiligt ist, wurde eine Epistasis-Analyse mit einer konstitutiv aktiven Variante des Cdc42 Proteins (Cdc42^{Q61L}) in *don1* und *don3* Zellen durchgeführt. Dadurch sollte überprüft werden ob der Phänotyp von *don1* Zellen, durch die Induktion von Cdc42^{Q61L} gerettet werden kann. Für *don3* Zellen war dies nicht zu erwarten, da Don3 „unterhalb“ von Cdc42 in diesem Signalweg angeordnet ist.

Auf dem Plasmid pRU11Δ*NotI*-*cdc42*-Q61L befindet sich das *cdc42*-Gen unter der Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors. Dieser ist in Gegenwart von Glucose reprimiert und in Anwesenheit von Arabinose aktiv. pRU11Δ*NotI*-*cdc42*-Q61L wurde in Wildtyp-, *don1* und *don3* Zellen transformiert, und die Transformanden wurden in Arabinose-enthaltendem

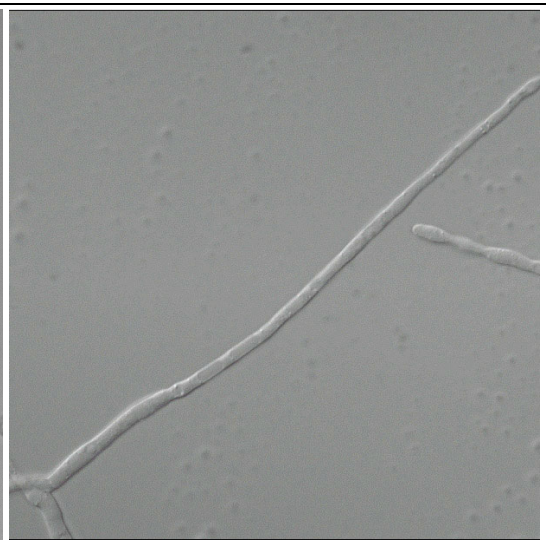
Medium induziert, was zur Expression des Cdc42 Proteins führte. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion des *cdc42*^{Q61L}-Gens wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

Die Expression von Cdc42^{Q61L} in *don1* Zellen führte dazu, dass sich die bäumchenartigen Strukturen auflösten: Es konnten schon nach kürzerer Zeit (4-6 Stunden) abgetrennte Einzelzellen beobachtet werden und nach längerer Induktion (20 Stunden) wurden nur noch Einzelzellen beobachtet, in denen die Septierung und Zelltrennung wieder normal ablief (**Abbildung 30**). Dass die Wildtyp-Morphologie in *don1* Zellen durch die Induktion des konstitutiv aktiven Cdc42 Allels wiederhergestellt werden konnte, bestätigt die Annahme, dass das Don1 Protein in der Kaskade oberhalb von Cdc42 einzuordnen ist und als Aktivator für Cdc42 dient. In *don3* Zellen verursachte die Expression des Cdc42^{Q61L} Proteins keinerlei Veränderung in der Morphologie und der Wildtyp-Phänotyp konnte nicht wiederhergestellt werden (**Abbildung 30**), was darauf hinweist, dass das Don3 Protein unterhalb von Cdc42 in der Septierungs-Kaskade eine Rolle spielt.

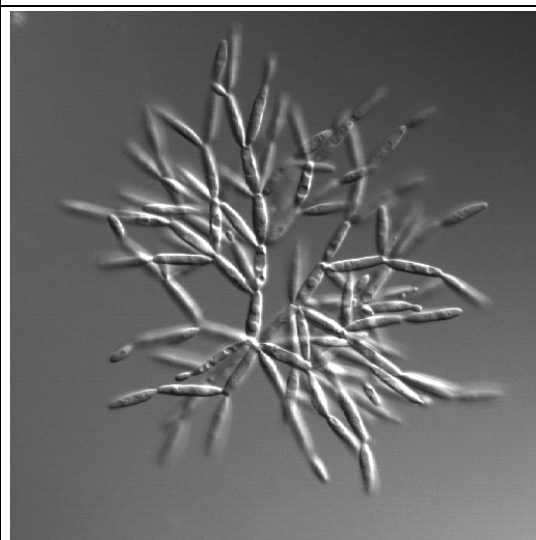
Nach längerer Induktion von Cdc42^{Q61L} wurde sowohl in Wildtyp-Zellen als auch in *don1*- und *don3*-Mutanten eine Hyperpolarisierung der Zellen beobachtet, die in einer stark elongierten Zellmorphologie bestand.

Abbildung 30: Einfluss der konstitutiv aktiven Variante von Cdc42 (Cdc42^{Q61L}) auf Wildtyp-, *don1* und *don3* Zellen. (folgende Seite) Die Expression von Cdc42^{Q61L} in Wildtyp-Zellen verursachte ein verlängertes Wachstum der Zellen. Während der bäumchenartige Phänotyp der *don1* Mutante durch die Induktion gerettet werden konnte und von den Bäumchen abgetrennte Zellen, später nur noch Einzelzellen beobachtet werden konnten, verursachte die Expression von Cdc42^{Q61L} in *don3* Zellen keine morphologische Veränderung: Die bäumchenartigen Strukturen blieben erhalten.

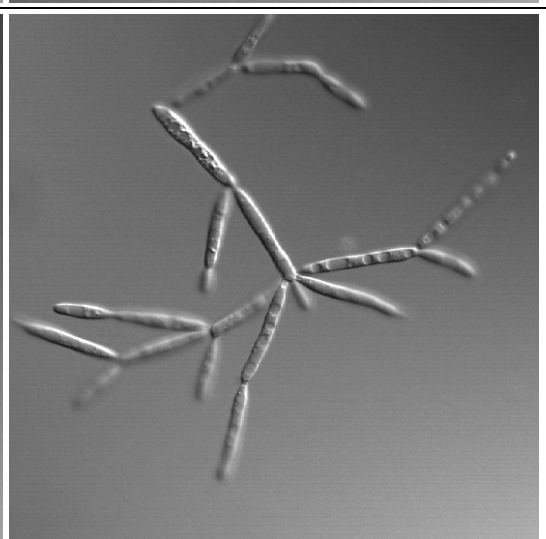
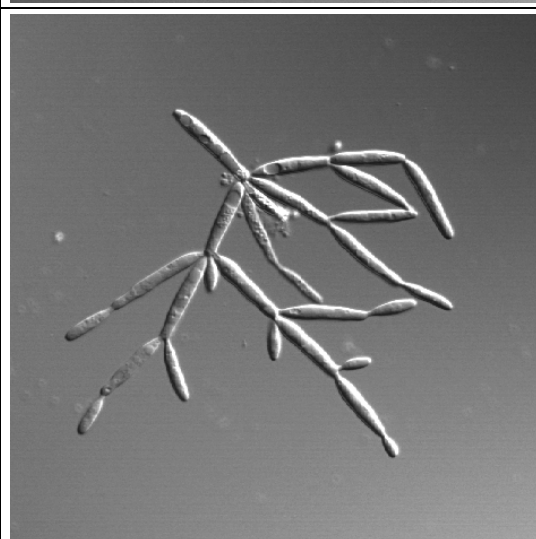
BUB8



don1



don3



uninduziert

Cdc42^{Q61L}

13.1. Der Phänotyp der *cla4* und *don5* Mutanten blieb nach der Induktion des konstitutiv aktiven Allel von *cdc42* erhalten

Expression des Cdc42^{Q61L} Proteins in den *cla4* und *don5* Mutanten führte nicht zu einer Wiederherstellung der Wildtypmorphologie. Die *cla4* Mutante zeigte weiterhin aufgeschwollene Zellen, die in allen Richtungen ihre Tochterzellen bildeten. Auch die bäumchenartigen Strukturen in der *don5* Mutante blieben erhalten (**Abbildung 32**). Längere Induktion der Zellen von beiden Mutanten führte jedoch im Gegensatz zu *don1* und *don3* auch nicht zu einer Hyperpolarisation. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Cla4 und Don5 Proteine in der Cdc42 Kaskade entweder „unterhalb“ von Cdc42 wirken oder eine Rolle in einem unabhängigen Signalweg spielen.

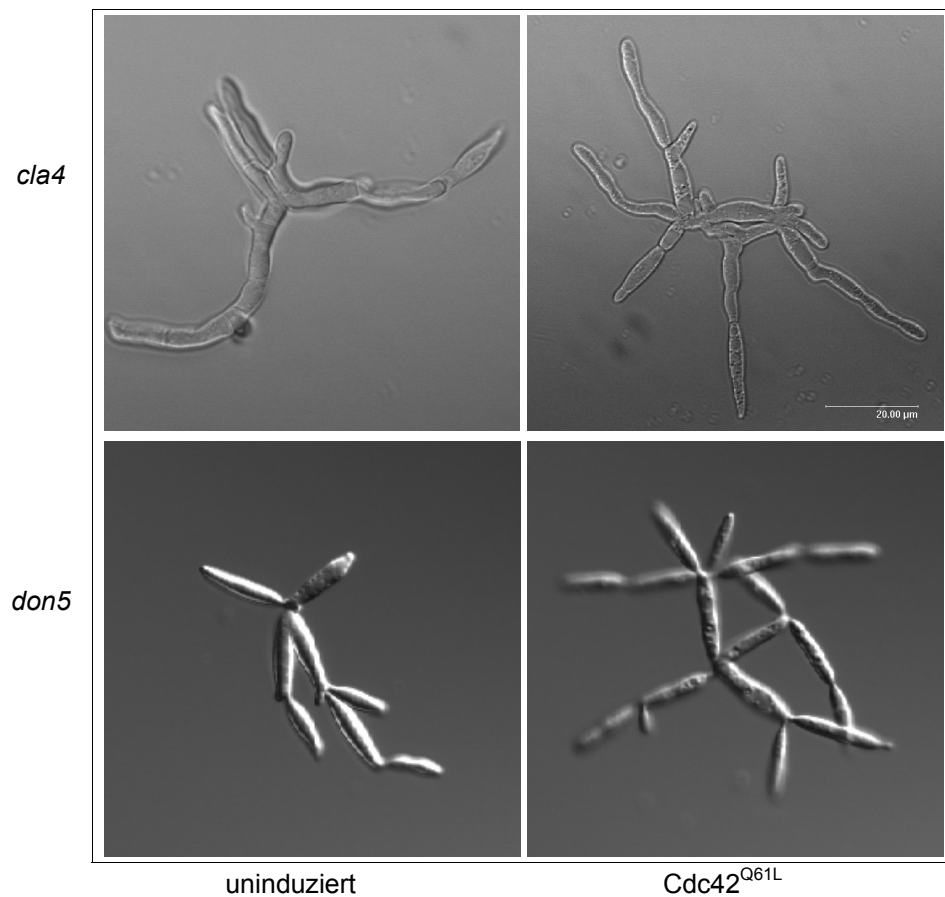


Abbildung 31: Die Morphologie von *cla4* und *don5* nach der Expression von Cdc42^{Q61L}. Die *cla4* Mutante zeigte nach der Induktion von Cdc42^{Q61L} weiterhin aufgeschwollene Zellen, die in allen Richtungen ihre Tochterzellen bildeten. Die bäumchenartige Strukturen in der *don5* Mutante blieben auch erhalten.

13.2. Der Phänotyp von *don6* Zellen kann durch die Expression des Cdc42^{Q61L} Proteins gerettet werden

Im Gegensatz zu *cla4* und *don5* Zellen zeigte die *don6* Mutante nach der Induktion von Cdc42^{Q61L} wieder normale, Wildtyp-ähnliche Morphologie, die bäumchenartigen Strukturen wurden aufgelöst und nach Induktion von Cdc42 wurden neben kleineren Bäumchen viele abgetrennte Einzelzellen beobachtet (**Abbildung 32**). Dies weist darauf hin, dass das Don6 Protein ebenso wie Don1 „oberhalb“ von Cdc42 in der Kaskade einzuordnen ist. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass in der *don6* Mutante das *cdc42* Gen direkt betroffen ist.

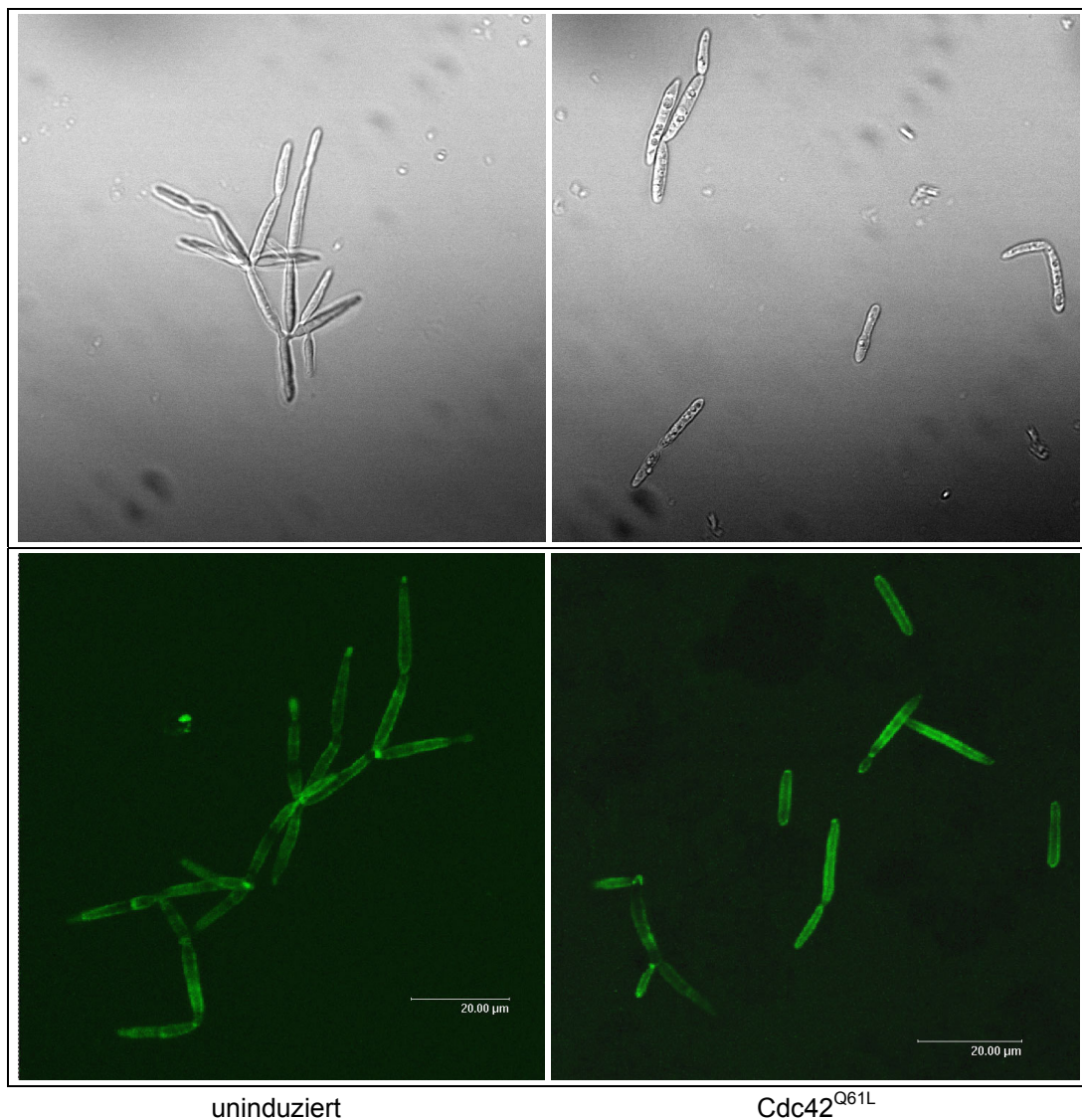


Abbildung 32: Cdc42^{Q61L} exprimierende *don6* Zellen weisen wieder Wildtyp-Morphologie auf. Der Phänotyp der *don6* Mutante konnte durch die Expression von Cdc42^{Q61L} gerettet werden, die bäumchenartigen Strukturen der Mutante sind zerfallen und es konnten Einzelzellen beobachtet werden. Im Gegensatz zur *don1* Mutante wurde jedoch die Chitin Verteilung in der Zellwand nicht wiederhergestellt.

13.3. Das *cdc42* Gen der *don6* Mutante weist eine stille Mutation auf

Für die Suche nach einer eventuellen Mutation in dem *cdc42* Gen der *don6* Mutante wurde das *cdc42* Gen aus BUB8 und aus der isogenen BUB8*don6* Mutante mit Hilfe der MB123 und MB130 Primer amplifiziert. Das etwa 570 bp Fragment wurde in den pCR-TOPO Vektor kloniert und jeweils drei Klone wurden sequenziert. Die Sequenz-Analyse zeigte, dass im *cdc42*-Gen des BUB8*don6* Stammes eine Base ausgetauscht wurde: Das Cytosin an der dritten Position des Kodon-Tripletts ACC, wurde durch Thymin ersetzt (ACT). Dies führte jedoch zu keinem Austausch in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Cdc42: an der Position 24 befand sich weiterhin ein Threonin (T) (Abbildung 33 und Abbildung 34).

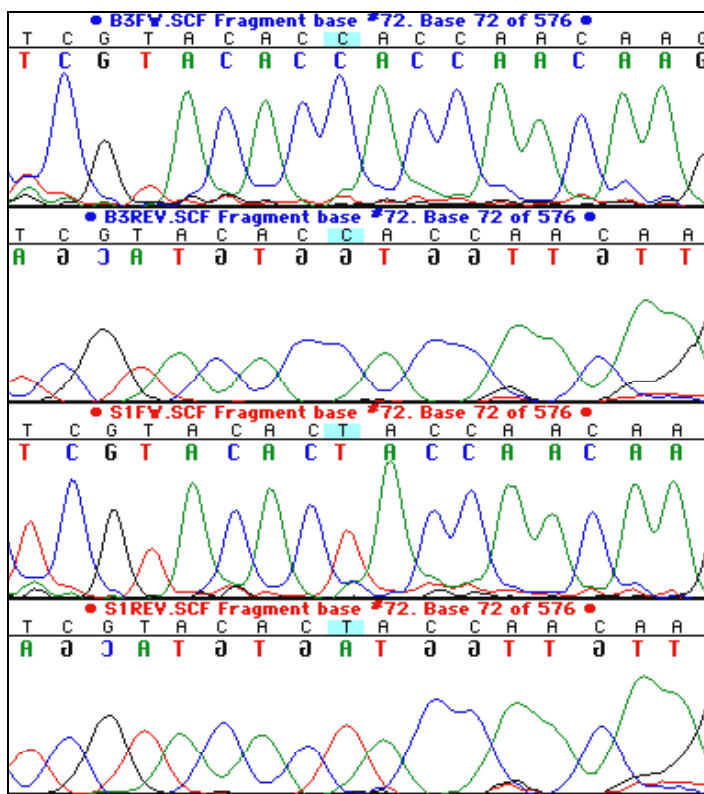


Abbildung 33: Sequenzanalyse des *cdc42* Genes in Wildtyp und in der *don6* Mutante.

Das *cdc42* Gen wurde in einer PCR Reaktion aus dem BUB8 Wildtyp-Stamm und aus der BUB8*don6* Mutante amplifiziert und in den pCR TOPO Vektor kloniert.

(A) Sequenzausschnitt des BUB8 *cdc42* Genes sequenziert mit dem M13 forward Primer

(B) Sequenzausschnitt des BUB8 *cdc42* Genes sequenziert mit dem M13 reverse Primer

(C) Sequenzausschnitt des *don6 cdc42* Genes sequenziert mit dem M13 forward Primer

(D) Sequenzausschnitt des *don6 cdc42* Genes sequenziert mit dem M13 reverse Primer.

Die Analyse wies auf einen Basenaustausch in der Position 72 hin (C > T) (blau schattiert).

Da stille Mutationen laut neueren Untersuchungen auf das pre mRNA Splicing Einfluss haben könnten (Cartegni *et al.*, 2002), ist es nicht auszuschließen, dass diese Punktmutation zu dem beobachteten Phänotyp führte. Um dies zu überprüfen, wurde die *don6* Mutante mit dem von Plasmid pRU11Δ*NotI-cdc42* (Mahlert, 2002), das das Wildtyp *cdc42*-Gen hinter dem regulierbaren *crg*-Promotor enthält, transformiert. Die Transformanten wurden in ein Arabinose-enhaltendes Medium gesetzt, das die Expression des *cdc42* Genes auf dem Plasmid induzierte. Die Zellen wurden über Nacht induziert und dann mikroskopiert. Nach

dieser Zeit waren die meisten bäumchenartigen Strukturen der Mutante zerfallen, es konnten fast ausschließlich nur Einzelzellen beobachtet werden (**Abbildung 35**). Dies deutet darauf hin, dass die beobachtete stille Mutation in *cdc42* für den Phänotyp der BUB8*don6* Mutante verantwortlich sein könnte. Eine Überprüfung dieser Vermutung könnte durch die Einführung der Punktmutation (C72T) in ein Wildtyp-Genom erfolgen: Wenn die Einführung der stillen Mutation zu dem *don6* Phänotyp führt, ist es wahrscheinlich, dass der Basenaustausch die Expression des *cdc42*-Gens beeinträchtigt. Eine alternative Erklärung wäre, dass der Phänotyp der *don6* Mutante auch durch Überproduktion von Wildtyp-Cdc42 wiederhergestellt werden kann und die eigentliche Mutation einen Effektor von Cdc42 betrifft.

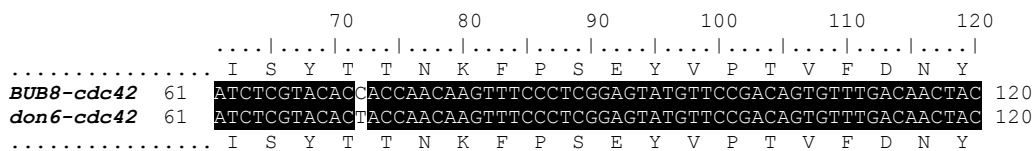


Abbildung 34: DNA- und Proteinvergleich des *cdc42* Genes in Wildtyp (BUB8) und in der BUB8*don6* Mutante. DNA- und Protein-Sequenz-Vergleich. Die markierte Aminosäure zeigt, dass der Basenaustausch zu keiner Veränderung in der Proteinsequenz führte.

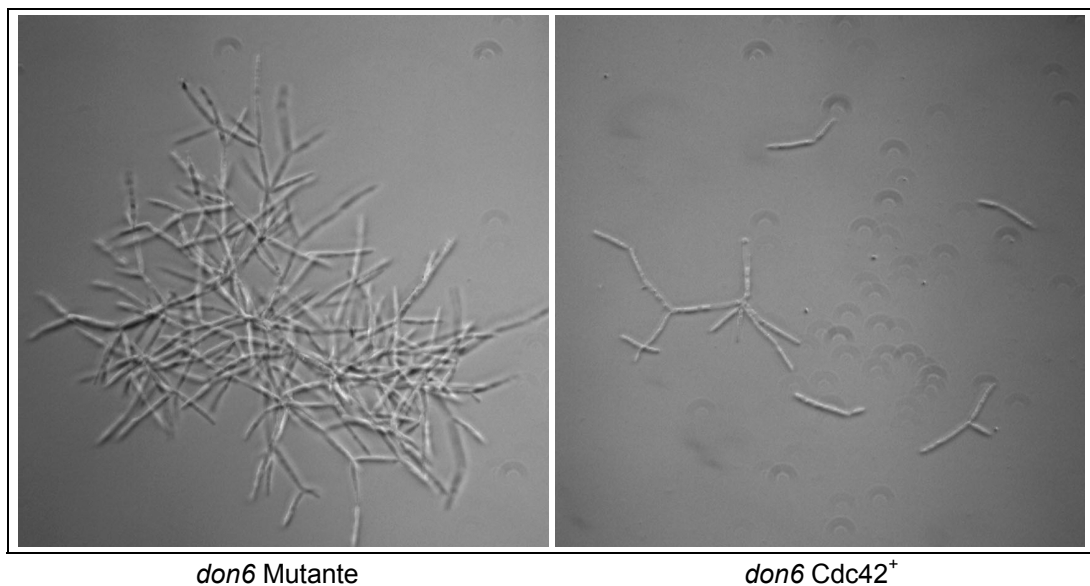


Abbildung 35: Komplementation der *don6* Mutante mit *cdc42*. *don6* Zellen wurden mit dem pRU11Δ*NotI-cdc42* Plasmid transformiert und die Transformanten ÜN in einem Arabinose-enthaltenden Medium induziert. Nach dieser Zeit wurden die bäumchenartigen Strukturen der Mutante abgebaut und es konnten in der Kultur fast nur Einzelzellen beobachtet werden.

13.4. Einordnung der neuen Cytokinese-Mutanten in die Cdc42 Kaskade

Die bisher gezeigten Ergebnisse der Epistasis-Analyse und des Komplementationsversuchs lassen die neu isolierten Cytokinese Mutanten oberhalb und unterhalb von Cdc42 in die Don1/Don3 Kaskade einordnen. Die Komplementation der *don6* Mutante durch das Wildtyp-Allel von *cdc42* lässt vermuten, dass *don6* mit *cdc42* allelisch ist (**Abbildung 36**).

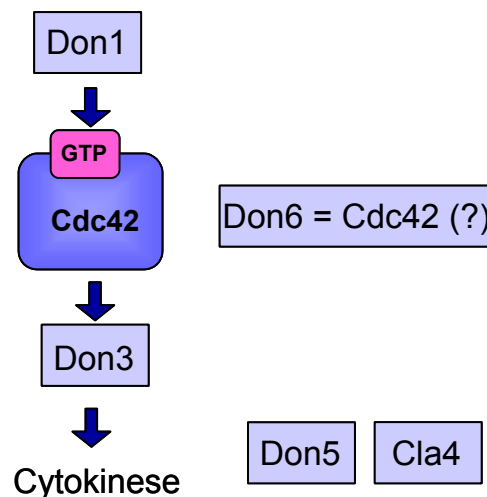


Abbildung 36: Hypothetische Anordnung der untersuchten Cytokinese Mutanten in die Cdc42 Signalisierungskaskade. Epistasis-Analyse der *don5*, *don6* und *cla4* Mutanten mit Cdc42^{Q61L} lassen vermuten, dass Don6 mit Cdc42 allelisch sein könnte und Don5 und Cla4 unterhalb von Cdc42 überschrieben werden oder in einer unabhängigen Kaskade eine Rolle spielen.

Der Wildtyp-Phänotyp konnte in den *don5* und *cla4* Mutanten durch die Expression von Cdc42^{Q61L} nicht hergestellt werden, was zeigt, dass die Don5 und Cla4 Proteine entweder unterhalb von Cdc42 aktiviert werden, oder sie gehören nicht zu der Cdc42 Signalisierungskaskade.

13.5. EM Untersuchung von *don1* Zellen nach der Induktion von Cdc42^{Q61L}

Um näher zu untersuchen, in welcher Weise die Expression des konstitutiv aktiven Cdc42 in *don1* Zellen zu einer erfolgreichen Zelltrennung führt, wurde licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die Septen in den Zellen 6 Stunden nach der Expression von Cdc42^{Q61L} mit Calcofluor White bzw. mit fluoreszenzmarkiertem WGA angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Außerdem

wurden nach 4, 16 und 21 Stunden nach der Induktion Proben entnommen und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet.

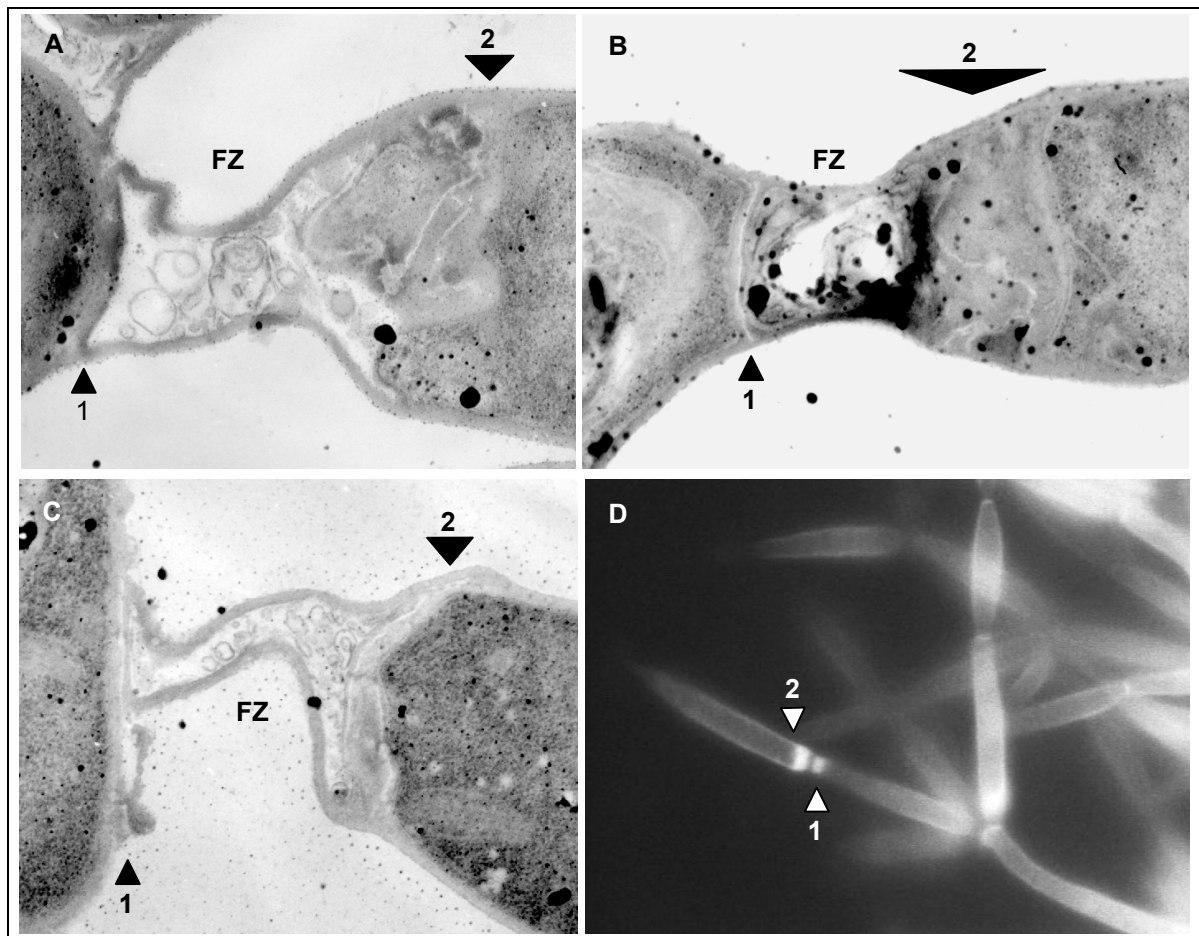


Abbildung 37: *don1* Zellen in verschiedenen Stadien nach der Induktion von $Cdc42^{Q61L}$. (1) primäres Septum an der Mutterseite (2) sekundäres Septum an der Tochterseite (FZ) Fragmentierungszone (A-C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen (A) Nach 4 Stunden Inkubation begann bereits die Ablagerung des sekundären Septums an der Tochterseite. (B) Nach 16 Stunden Inkubation konnte ein verdicktes sekundäres Septum beobachtet werden. (C) Die Aufnahme 21 Stunden nach der Induktion von $Cdc42^{Q61L}$ zeigt zwei sich voneinander trennende Zellen. (D) Lichtmikroskopische Aufnahme, Calcofluor Färbung: 6 Stunden nach der Induktion konnte die Bildung des sekundären Septums beobachtet werden.

Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte, dass *don1* Zellen 6 Stunden nach der Induktion von $Cdc42^{Q61L}$ wieder fähig waren, ein sekundäres Septum zu bilden und die Zelltrennung durchzuführen. Dabei wurde beobachtet, dass die Fluoreszenz an der Stelle der sekundären Septums oft deutlich stärker war als die Färbung des primären Septums (Abbildung 37, D). Dies deutet darauf hin, dass infolge der unnatürlich langen Induktion des aktiven $Cdc42$ ein erheblich dickeres sekundäres Septum gebildet wurde. Diese Teilungszone wurde auch elektronenmikroskopisch untersucht, und es konnte auf den Aufnahmen beobachtet werden,

dass nach 4 Stunden Inkubation die Ablagerung der Zellwandmaterialien an der Stelle des sekundären Septums anging und sie mit wachsender Dauer der Induktion immer ausgeprägter wurde, bis sich die Zellen voneinander trennten (**Abbildung 37, A, B und C**). Diese Daten zeigen, dass die Expression von Cdc42^{Q61L} bei der Ablagerung der Zellwandmaterial an der Stelle des sekundären Septums eine entscheidende Rolle spielt.

Wie bereits die Calcofluor-Färbungen zeigten, konnte auch durch WGA-Färbung in den induzierten *don1* Zellen ein sekundäres Septum beobachtet werden, das eine stärkere Fluoreszenz als das primäre Septum aufwies. Im Gegensatz dazu war in *don3* Zellen auch mit der WGA-Färbung immer nur ein Septum zu sehen (**Abbildung 38**). Mit WGA war jedoch in den nicht induzierten *don1* und *don3* Zellen eine im Vergleich zur Wildtypsituation stärkere Fluoreszenz der gesamten Zellwand zu beobachten.

Interessanterweise wurde durch die Induktion von Cdc42^{Q61L} in *don1* und *don3* Zellen die normale Ablagerung von Chitin in der Zellwand wiederhergestellt: Die Zellwand zeigte weniger starke Fluoreszenz und die Septa waren stärker gefärbt, was darauf hinweist, dass Cdc42 auch bei der Regulation der isotropen Ablagerung von Zellwandmaterialien in der Zellwand eine Rolle spielt, wobei die korrekte Ablagerung anscheinend unabhängig von Don3 ist, da auch in *don3*-Mutanten dieser Effekt beobachtet werden kann.

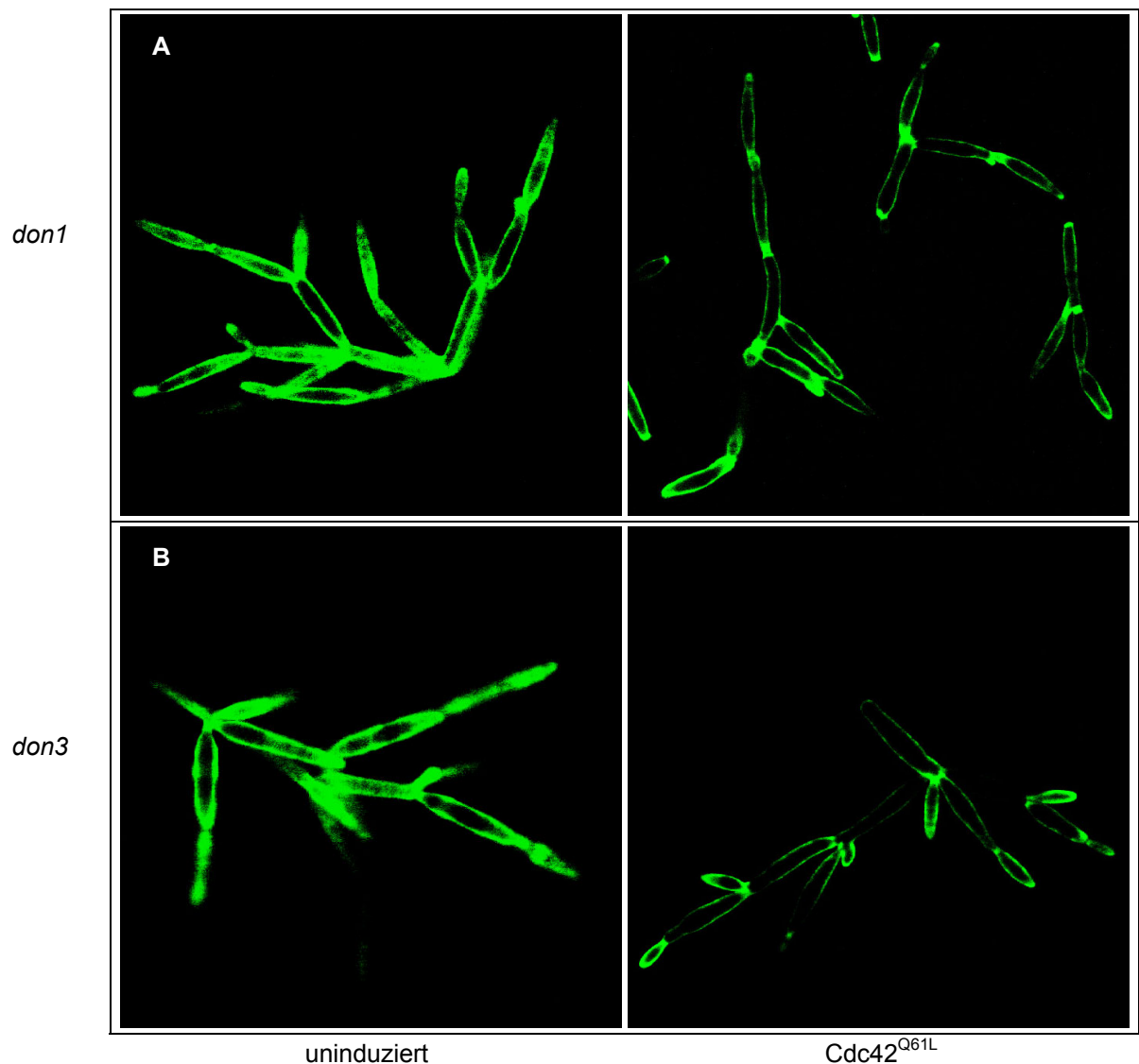


Abbildung 38: Die Expression von Cdc42^{Q61L} stellt die normale Ablagerung von Chitin in der Zellwand der *don1* und *don3* Zellen wieder her. Uninduzierte *don1* und *don3* Zellen zeigen eine starke Fluoreszenz der verdickten Zellwand im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen, wenn Chitin mit WGA gefärbt wird. Die normale Ablagerung von Chitin in der Zellwand wurde jedoch durch die Induktion von Cdc42^{Q61L} zurückgestellt: In beiden Mutanten zeigte die Zellwand weniger starke Fluoreszenz.

Da die Expression von Cdc42^{Q61L} in den *don1* und *don3* Mutanten eine Wiederherstellung der normalen Zellwandmorphologie bewirkte, wurde untersucht, ob die Expression von Cdc42^{Q61L} auch in *cla4* und *don5* Zellen eine normale Ablagerung von Zellwandmaterialien wiederherstellt. Die Färbungen der induzierten *cla4* und *don5* Zellen zeigten jedoch keine Veränderung, die Zellwand zeigte weiterhin eine starke Fluoreszenz (**Abbildung 39, B**).

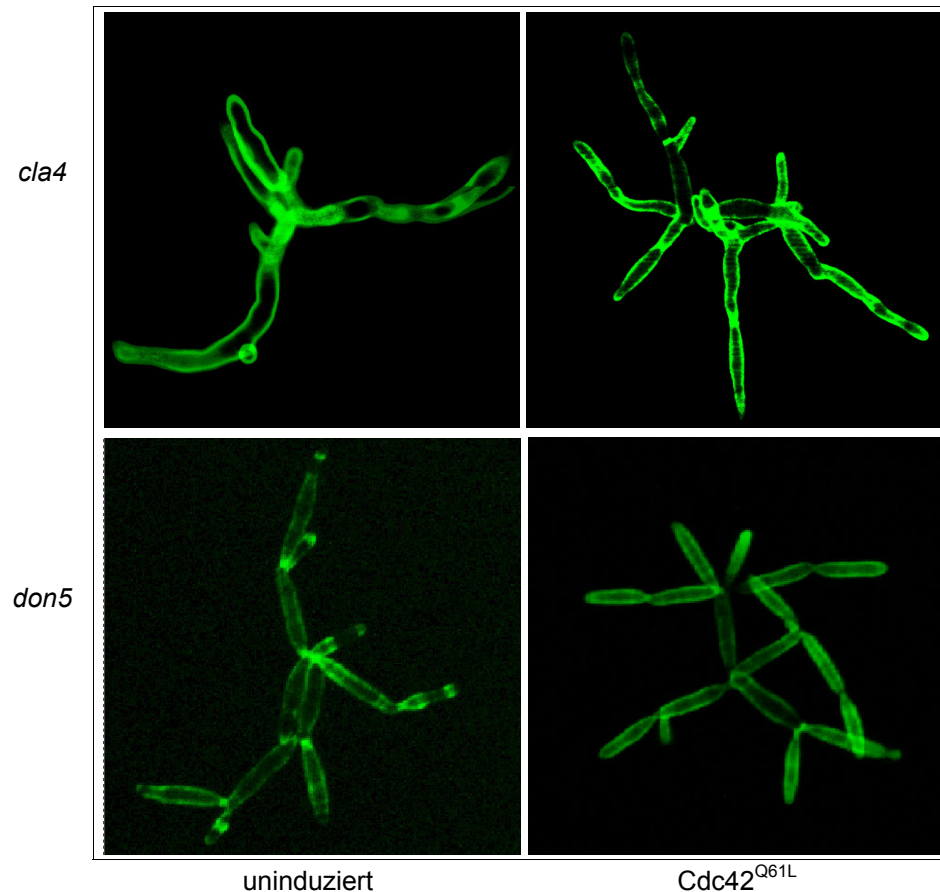


Abbildung 39: Die normale Chitin-Ablagerung in der Zellwand von *cla4* und *don5* konnte durch die Expression von $Cdc42^{Q61L}$ nicht wiederhergestellt werden. Die Färbungen der induzierten *cla4* und *don5* Zellen zeigten keine Veränderung, die verdickte Zellwand wies weiterhin eine starke Fluoreszenz auf.

14. Dominant negative Varianten von Cdc42 beeinflussen das polarisierte Wachstum

Die Expression der konstitutiv aktiven Variante von Cdc42 ($Cdc42^{Q61L}$) verursachte in den Zellen ein langgestrecktes Wachstum, was vermuten ließ, dass Cdc42 einen Einfluss auf das polare Wachstum ausübt. Um dies zu überprüfen, wurde untersucht, wie sich die Expression dominant negativer Varianten von Cdc42 auf das Wachstum auswirkt. Dazu wurden zwei verschiedene Allele von Cdc42 in Wildtyp-Zellen transformiert: $Cdc42^{T17N}$ trägt eine Mutation in der GDP/GTP Bindedomäne und ist immer inaktiv, weil das Protein in seiner GDP-gebundenen Form gehalten wird. Die V44A Version von Cdc42 ($Cdc42^{V44A}$) ist defekt in der Effektor-Bindedomäne und ist dadurch nicht fähig, aktiviert zu werden und bestimmte Effektoren weiterzuaktivieren. Beide Konstrukte wurden von M. Piscator hergestellt, indem die Mutation durch PCR eingeführt und das mutierte Cdc42 Allel durch den *crg*-Promotor exprimiert wurde.

Nach der Transformation des $Cdc42^{T17N}$ Konstruktes (pRU11 Δ *NotI*-*cdc42*-T17N) in FB2 Wildtyp-Zellen wurden die Transformanten zur Induktion des *crg*-Promotors über Nacht in Arabinose-haltigem Medium induziert und dann mikroskopiert. Nach dieser Zeit zeigten die Zellen eine starke morphologische Veränderung: Sie bildeten ihre Tochterzellen an falschen Stellen, zum Teil an der Seite der Zellen. Die Mutterzellen bildeten weitere Knospen, bevor die vorherigen voll ausgebildet und abgetrennt wurden und diese Knospen waren lang und dünn (**Abbildung 40, B**). Da die $Cdc42^{T17N}$ exprimierenden Zellen ihre Knospen nicht wie uninduzierte Wildtyp-Zellen jeweils an den gegenüberliegenden Polen bilden, weisen auch diese Beobachtungen auf einen Polaritätsdefekt hin.

In der WGA Färbung der Wildtyp-Zellen, die das dominant negative $Cdc42$ exprimierten, zeigte sich, dass die neugebildeten Knospen eine dickere Zellwand aufwiesen (**Abbildung 40**). Diese Ablagerung erinnerte an die verdickte Zellwand der *don*-Mutanten, obwohl interessanterweise $Cdc42^{T17N}$ exprimierende Wildtyp-Zellen keine *don*-Morphologie zeigten. Dies könnte darauf hinweisen, dass mindestens noch ein Effektor von $Cdc42$ außer Don3 existieren müsste, dessen Verlust zu einem Phänotyp führen müsste, der dem dieser $Cdc42^{T17N}$ exprimierenden Zellen ähnelt. Dieser Phänotyp, der die Folge des Verlustes der Polarität war, erinnerte eher an den der *cla4* Mutante, die ihre Tochterzellen gleichermaßen in aller Richtungen bildete.

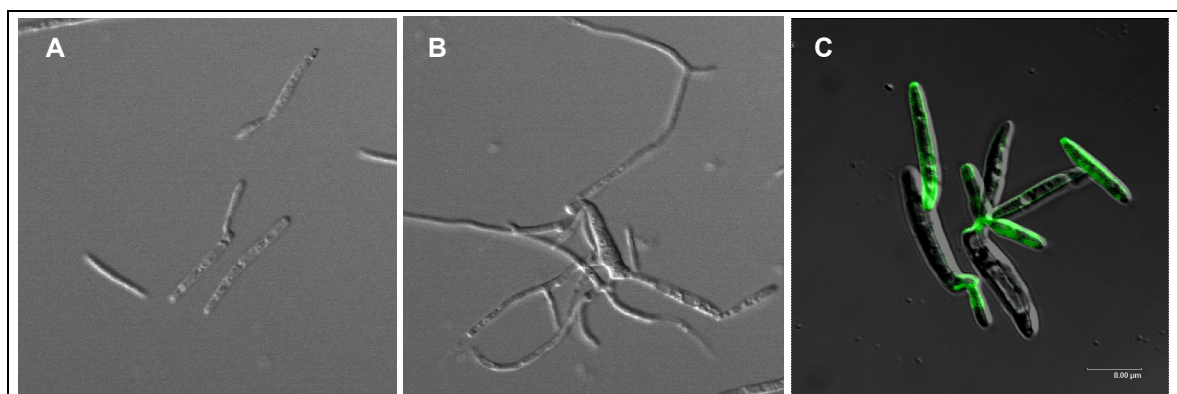


Abbildung 40: $Cdc42^{T17N}$ exprimierende Wildtyp-Zellen zeigen den Verlust der Polarität. (A) FB2 Wildtyp-Zelle (B) $Cdc42^{T17N}$ exprimierende FB2 Zellen (C) WGA Färbung von induzierten Wildtyp-Zellen (überlappendes Bild). Die T17N Variante von $Cdc42$ exprimierende Wildtyp-Zellen bilden ihre Knospen an allen möglichen Stellen der Zelle und zeigen Polaritätsdefekt.

Um zu überprüfen, ob sich die Expression des dominant negativen Cdc42^{T17N} auch in Abwesenheit des Effektors Don3 auf die Zellpolarität auswirkt, wurde das Cdc42^{T17N} Konstrukt (pRU11Δ*NotI*-*cdc42*-T17N) in *don3* Zellen transformiert. Überraschenderweise zeigten Cdc42^{T17N} exprimierende *don3* Zellen keine Störung in der Polarität, jedoch waren die neu gebildeten Zellen in den bäumchenartigen Strukturen nach Expression von Cdc42^{T17N} erheblich kürzer als vor der Induktion. Die Morphologie der Zellen erschien jedoch regelmäßig und das Knospungsmuster entsprach dem von uninduzierten *don3* Zellen (Abbildung 41).

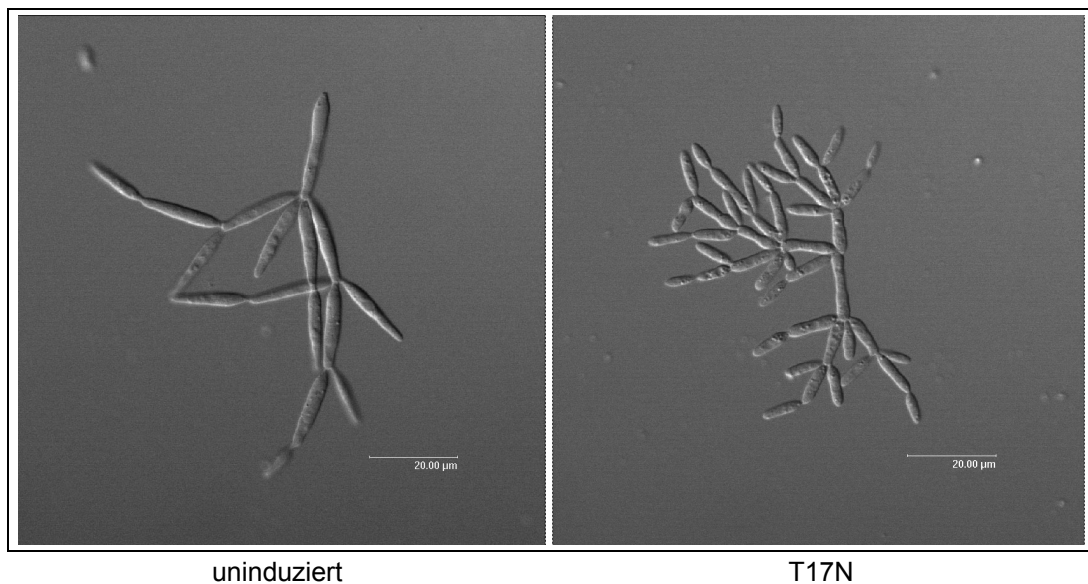


Abbildung 41: Cdc42^{T17N} exprimierende *don3* Zellen zeigen keinen Polaritätsdefekt. Cdc42^{T17N} exprimierende *don3* Zellen wiesen keine Störung in der Polarität auf, obwohl sie eine morphologische Veränderung zeigten: Die Zellen in den bäumchenartigen Strukturen waren verkürzt.

14.1. Die *cdc42*^{V44A} Mutante zeigt einen *cla4*-ähnlichen Phänotyp

Die Mutation *cdc42*^{V44A} repräsentiert eine weitere Klasse dominant negativer Effektor-Mutationen, die im Yeast-Two-Hybrid System mit der Interaktion von Cdc42p mit der *S. cerevisiae* PAK-ähnlichen Kinase Cla4p und ebenso Gic1p und Gic2p, aber nicht mit Ste20p oder Skm1p interferierte (Davis *et al.*, 1998). Um festzustellen ob diese Mutation auch in *U. maydis* zu einer Verhinderung der Interaktion von Cdc42 mit Don3 führt, wurde das Cdc42^{V44A} Protein ebenfalls unter der Kontrolle des induzierbaren *crg*-Promotors in Wildtypzellen exprimiert. Sollte die in dieser Mutante betroffene Mutation die Interaktion mit

Don3 stören, so wäre zu erwarten, dass nach der Induktion von $Cdc42^{V44A}$ Zellen mit *don3* Morphologie beobachtet werden.

Nach Induktion von $Cdc42^{V44A}$ konnten vergrößerte, dickere Zellen beobachtet werden, die entweder deformierte oder teils mehrere, verlängerte Knospen hatten, die zum Teil an den Seiten der Zellen gebildet wurden (**Abbildung 42**). Nach längerer Induktion waren aus mehreren Zellen bestehende Ketten zu sehen, aber die induzierten Zellen zeigten keine eindeutigen Cytokinese-Defekt.

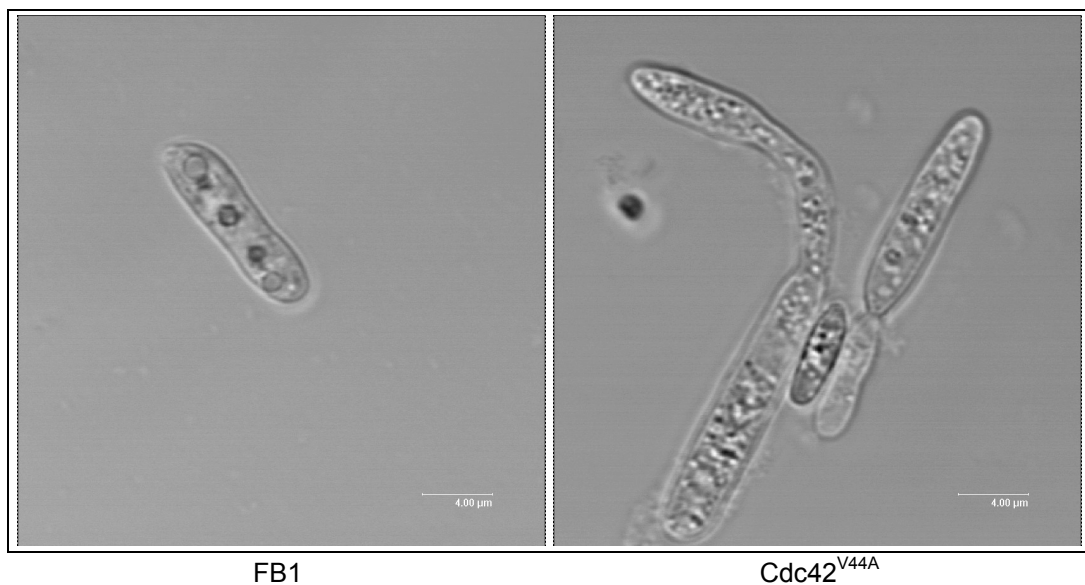


Abbildung 42: $cdc42^{V44A}$ Zellen zeigen verdickten Phänotyp. FB1 $Cdc42^{V44A}$ Zellen wurden in Arabinose-enhaltenem Medium induziert und zeigten verdickten Phänotyp, der aber nicht an *don*-Zellen erinnerte.

14.1.1. $cdc42^{V44A}$ Zellen zeigen abnormal delokalisierte Chitin-Ablagerung

Nach der Induktion von $cdc42^{V44A}$ wurden die Zellen mit WGA gefärbt und mikroskopisch untersucht. Während uninduzierte Wildtyp-Zellen eine verstärkte Färbung an den wachsenden Spitzen der Mutterzelle und der Knospen aufwiesen während der Rest der Zellwand in der Mutter- oder Tochterzelle weniger gefärbt war (**Abbildung 43, A**), zeigte die Chitin Färbung nach der Induktion starke Fluoreszenz über die ganze Zellwand von kleineren und größeren Knospen (**Abbildung 43, B-C**). Außerdem konnten in den großen, aus mehreren Zellen bestehenden netzartigen Strukturen die Septen nicht mehr deutlich gefärbt werden, wie es auch im Falle der *cla4* Mutante schon beobachtet wurde (**Abbildung 43, E und F**).

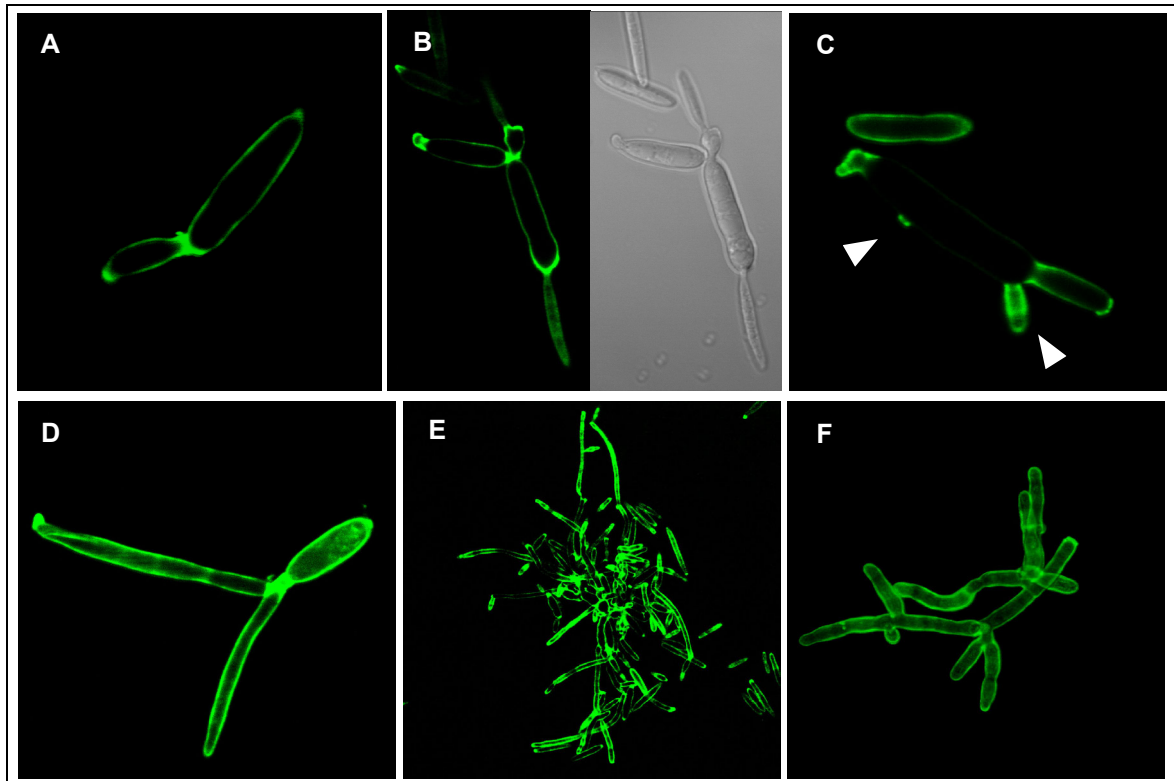


Abbildung 43: Chitin Lokalisierung in *cdc42*^{V44A} Zellen. Die V44A Variante von *cdc42* wurde unter der Kontrolle des induzierbaren *crg*-Promotors in FB1 Zellen exprimiert. Chitin wurde in den Zellen mit WGA gefärbt und die Zellen wurden fotografiert. (A) Wildtyp-Zellen zeigen eine starke Fluoreszenz an den Stellen der Knospenbildung (B-E) *Cdc42*^{V44A} Mutante Zellen sind aufgeschwollen und die neuen Knospen, die zum Teil sehr krank aussehen, zeigen über die ganze Zellwand *cla4* ähnliche starke Chitinfärbung. Die Knospenbildung erfolgt unpolarisiert auch an den Seiten der Zellen und es werden auch mehrere Knospen gebildet. Größere Bäumchen oder netzartige Verzweigungen aus mehreren Zellen, wie bei der *cla4* Mutante, konnten auch beobachtet werden. (F) *cla4* Mutante.

14.1.2. *cdc42*^{V44A} Zellen zeigen einen Mitosedefekt

cdc42^{V44A} exprimierende Zellen wurden mit dem DNA-Farbstoff SYTO-11 gefärbt und mikroskopisch untersucht. Neben normal aussehenden Zellen mit je einem Kern konnten auch Zellen mit mehreren Knospen beobachtet werden, die jeweils einen Kern und leere Knospen aufwiesen, und teilweise auch solche mit mehreren Kernen enthaltende Zellen beobachtet werden (Abbildung 44, B). Ein ähnlicher Phänotyp kann auch in der *cla4* und vor allem in der $\Delta cdc10$ Mutante beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass die *cdc42*^{V44A} Mutation zu einer Störung des Zellzyklus führt, was sich in der ungleichmäßigen Kernverteilung unter Mutter- und Tochterzellen zeigt.

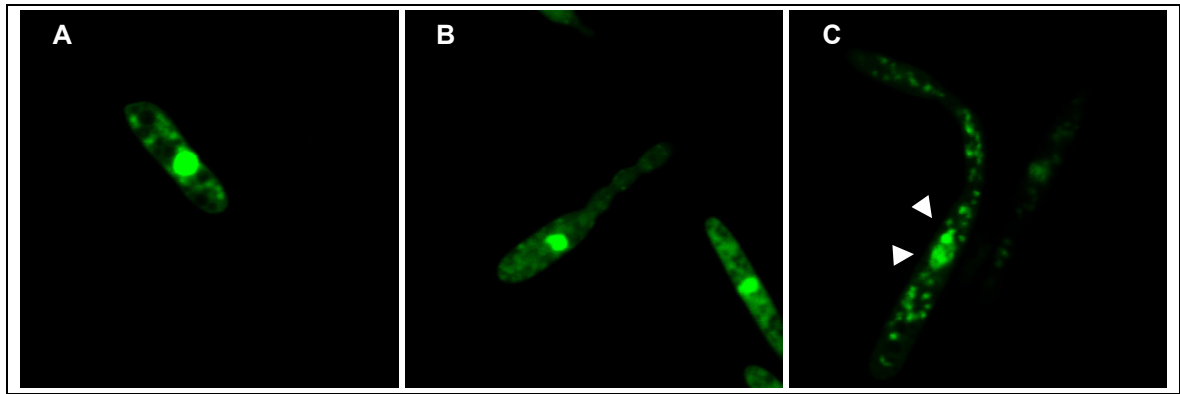


Abbildung 44: Kernlokalisierung in *cdc42*^{V44A} Zellen. (A) Wildtyp-Zellen (FB1) sind haploid und enthalten einen Zellkern. (B-C) *cdc42*^{V44A} Zellen bilden krank aussehende Knospen, die jedoch keinen Zellkern enthalten. Einige Zellen vollziehen zwar die Kernteilung, der Kern wird jedoch nicht in die Knospe transportiert, so entstehen mehrkernige Zellen und leere Knospen.

15. Kreuzungstest auf Charcoal-Platten

Weder das *don1* noch das *don3* Gen wird für das Mating, das filamentöse Wachstum der Dikaryon, die Sporenbildung oder die Pathogenität in Maispflanzen benötigt (Weinzierl *et al.*, 2002). Um einen möglichen Einfluss der neuisolierten morphologischen Mutanten auf die Pathogenität zu untersuchen, wurden kompatible Kreuzungen der Mutanten auf Charcoal-Platten untersucht.

Alle untersuchten neuisolierten *don*-Mutanten waren fähig, mit kompatiblen Wildtyp-Zellen auf Charcoal-Platten weißes Luftmyzel zu bilden, wobei nur die Kreuzungen von *don4*, *don6* und *dol1* Zellen eine vergleichbar starke Myzelbildung wie eine Wildtyp-Kreuzung zeigten. Die *don5* Mutante zeigte in der Kreuzung mit Wildtyp-Zellen eine verlangsamte Myzelbildung, die *cla4* Mutante war ebenfalls nur eingeschränkt fähig mit Wildtyp-Zellen zu kreuzen, nach einem Tag Inkubation konnten nur ganz wenige und sehr kurze Luftmyzelien beobachtet werden. Dies könnte eventuell auf das verlangsamte Wachstum und die geringere Anzahl der Zellen zurückgeführt werden. Die Kreuzungen von kompatiblen *don4* und *cla4* Zellen ergaben eine etwas verlangsamte Luftmyzelbildung, und kompatible *don5* Zellen bildeten nur sehr wenige Hyphen. Die *don6* und *dol1* Mutanten bildeten in der Wildtyp-Kreuzung ähnliches Luftmyzel (**Abbildung 45**).

16. Pathogenität

Maispflanzen wurden mit Mischungen kompatibler Mutantenzellen infiziert, um zu überprüfen, ob die neu isolierten Mutanten noch in der Lage sind, Pflanzen zu infizieren. Nach 21 Tagen wurden die Pflanzen überprüft. Bei der Infektion von Maispflanzen mit *doll* Zellen war eine normale pathogene Entwicklung, wie Chlorose, Anthocyaninbildung, normale Tumorentwicklung und Teliosporenbildung, zu beobachten. Die Kreuzung von *don4* Zellen führte zu einer reduzierten Tumorbildung, wobei sich die entstandenen Tumore auch in der Größe und in der Länge der Entwicklungszeit und in der Anzahl der gebildeten Tumoren und Sporen von den durch die Wildtyp-Kreuzung BUB8 x FB1 induzierten Tumoren unterschieden (**Tabelle 8**). Die Tumore wurden nach längerer Zeit gebildet, waren nur wenige mm groß und enthielten entweder keine oder nur sehr wenige Sporen.

Die Kreuzung von *don5* kompatiblen Zellen führte zu keiner Tumorentstehung, was eventuell mit der verringerten Fähigkeit zur Fusion zusammenhängen könnte. Überraschenderweise zeigten die kompatiblen Kreuzungen der *don6* Mutante keine Tumorbildung in Maispflanzen, obwohl die Zellen im Charcoal-Test eine starke Luftmyzelbildung aufwiesen. Dies könnte darauf hinweisen, dass *don6* Zellen zwar noch fähig sind zu fusionieren, aber in ihrer weiteren Entwicklung gestört sind. Welcher Schritt in der Pathogenität betroffen ist, müssten weitere Versuche beantworten. Die *cla4* Mutante zeigte eine reduzierte Luftmyzelbildung, verlangsamtes Wachstum und eine stark veränderte Zellmorphologie, was erklären könnte, warum keine Tumorentstehung beobachtet werden konnte.

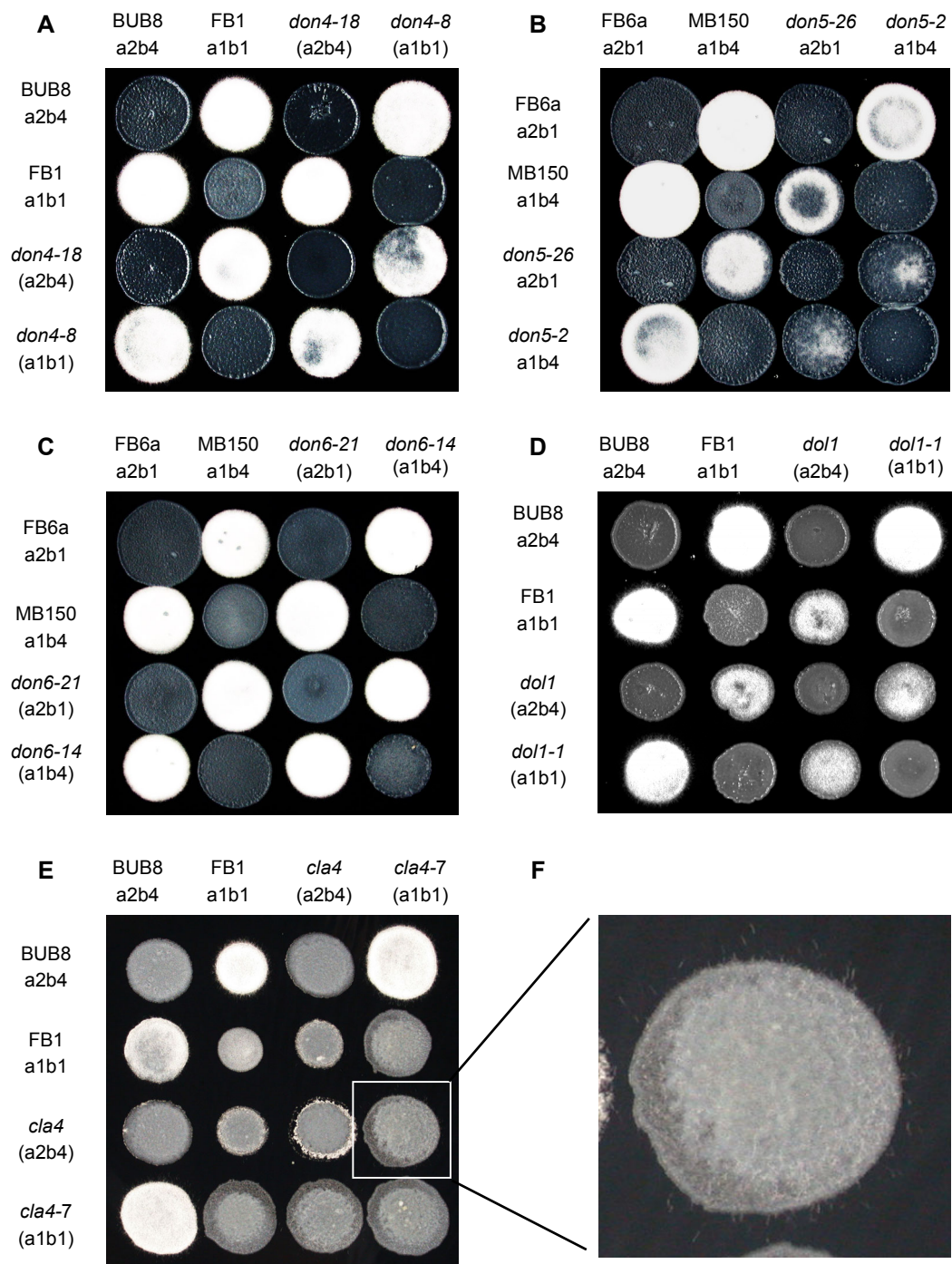


Abbildung 45: Kreuzungstest der *don*-Mutanten mit Wildtyp-Zellen und mit sich selbst. Kompatible Kreuzungen der *don4* Mutante zeigten wenig reduzierte, die der *don5* und *cla4* Mutanten mehr reduzierte Luftmyzelbildung. Die *don6* und *dol1* Mutanten zeigten normale, wildtyp-ähnlich starke Myzelbildung. (A) *don4* Kreuzungen (B) *don5* Kreuzungen (C) *don6* Kreuzungen (D) *dol1* Kreuzungen (E) *cla4* Kreuzungen (F) Kreuzung kompatibler *cla4* Mutanten (Ausschnitt von E)

Tabelle 8: Symptome der Infektion durch kompatible Wildtyp und kompatible Mutante Kreuzungen.

	Luftmyzelienbildung	Infizierte Pflanzen	Gebildete Tumoren	%
FB1 x BUB8	+++	10	5	
<i>don4</i> x <i>don4</i>	++	47	11	23
<i>don5</i> x <i>don5</i>	+-	50	0	0
<i>don6</i> x <i>don6</i>	+++	50	0	0
<i>dol1</i> x <i>dol1</i>	+++	50	45	90
<i>cla4</i> x <i>cla4</i>	+	50	0	0

Nach der Kreuzung in Maispflanzen wurde die Tumorbildung nach 21 Tagen kontrolliert. Die kompatible Kreuzung von *dol1* Zellen zeigte der Wildtyp-Kreuzung ähnliche Chlorose, Anthocyaninbildung, normale Tumorentwicklung und letztendlich Teliosporenbildung. Die kompatible Kreuzung von *don4* Zellen führte zu einer reduzierten Tumorbildung. Die Tumore wurden nach längerer Zeit gebildet, waren nur wenige mm groß und enthielten entweder keine oder nur sehr wenige Sporen. Die Kreuzung von *don5* kompatiblen Zellen führte zu keiner Tumorentstehung, was eventuell auf die reduzierten Fusionen zurückzuführen sein könnte. Die *don6* Kreuzung führte zu keiner Tumorbildung in Maispflanzen, obwohl die Zellen im Charcoal-Test normale Luftmyzelbildung aufwiesen. Die *cla4* Mutante zeigte eine reduzierte Luftmyzelbildung, verlangsamtes Wachstum und eine kranke Morphologie, was erklären könnte, warum keine Tumorentstehung beobachtet werden konnte.

17. Komplementation der *don*-ähnlichen Mutanten mit einer Cosmidbank

Um die Gene zu identifizieren, die in den neuen Cytokinese-Mutanten betroffen sind, wurden die Mutanten mit einer autonom replizierenden genomischen *U. maydis* Cosmid-Bank transformiert. Für die *don5*, *dol1* und *cla4* Mutanten, gelang es, Transformanden mit Wildtyp-Morphologie zu isolieren (**Tabelle 9**). Um unter den Transformanden solche anzureichern, die wieder eine normale Cytokinese aufwiesen und als Einzelzellen vorliegen, wurden die Zellen im Falle der *don5* und *dol1* Mutanten von den Regenerationsagar-Platten mit 10 ml sterilem Wasser abgewaschen und durch eine Nylon-Membran oder einen Faltenfilter mit einer Porengröße von 10 µm durchlaufen gelassen. Unter diesen Bedingungen können die komplementierten Einzelzellen oder aus 2-3 Zellen bestehende Strukturen mit der Flüssigkeit durchlaufen sind. Die filtrierte Kulturen wurden auf mehreren Cbx-PD-Platten ausplattiert,

auf denen die Komplementanden anhand ihrer Wildtyp-Kolonien erkannt werden konnten. Die Zellen der komplementierenden Transformanden wurden mikroskopisch untersucht und diejenigen, die Wildtyp-ähnlich aussahen, wurden für die Reisolierung der komplementierenden Cosmide ausgewählt. Im Falle der *cla4* Mutante konnten die Komplementanden direkt von der Regenerationsplatte isoliert werden (siehe Kapitel 18).

Tabelle 9: Komplementation der *don*-ähnlichen Mutanten.

	Komplementation	Cosmid Reisolierung
<i>don4</i>	–	
<i>don5</i>	+	–
<i>don6</i>	–	
<i>dol1</i>	+	–
<i>cla4</i>	+	+

Im Falle von *don5* konnten sieben unabhängige Transformanden (Praktikumsarbeit von Maik Böhmer), bei *dol1* eine einzige Carboxinresistente Transformande isoliert werden, die wieder einen Wildtyp-Phänotyp aufwies. Um die komplementierenden Cosmide zu reisolieren, wurde Gesamt-DNA aus den Komplementanden präpariert und in *E. coli* Zellen transformiert. Für diese Komplementanden konnten auf diesem Wege keine Cosmide reisoliert werden. Dies könnte daran liegen, dass das Cosmid ins Genom integriert vorliegt. Es gelang zwar mit Hilfe der Vektorette PCR Methode aus den Komplementanden Randfragmente zu amplifizieren, die für die Isolierung von Cosmidklonen herangezogen wurden. Jedoch konnte mit den so isolierten Cosmiden keine Komplementation dieser Mutanten erzielt werden.

18. Isolierung des der *cla4* Gens aus der *U. maydis* Cosmid-Bank

Bei der Komplementation der *cla4*-Mutante mit der Cosmid-Bank konnten insgesamt zwei Kolonien mit Wildtyp-Phänotyp isoliert werden. Aus beiden Komplementanden wurde Gesamt-DNA isoliert und in XL1Blue Bakterienzellen transformiert. Anschließend wurde das Cosmid aus den Bakterienzellen isoliert und eine Restriktionskarte erstellt. Diese zeigte, dass die beiden Komplementanden dasselbe Cosmid enthielten. Um sicherzustellen, dass das isolierte Cosmid (pScos*Umcla4*) für die Komplementation der *cla4* Mutante verantwortlich war, wurde das pScos*Umcla4* in *cla4* Zellen zurücktransformiert. Da dies zur Komplementation führte, wurde dieses Cosmid für die weitere Analyse und Subklonierung verwendet.

18.1. Subklonierung des *cla4*-Gens

Der etwa 43 kb große pScos*Umcla4* Cosmid wurde mit *Bam*HI geschnitten und das etwa 28 kb Fragment) nach Religation in *cla4*-Zellen transformiert. Das religierte Cosmid pScos*Umcla4*Δ*Bam*HI komplementierte die *cla4* Mutante, und wurde für die weitere Subklonierung und Kartierung verwendet (Abbildung 46).

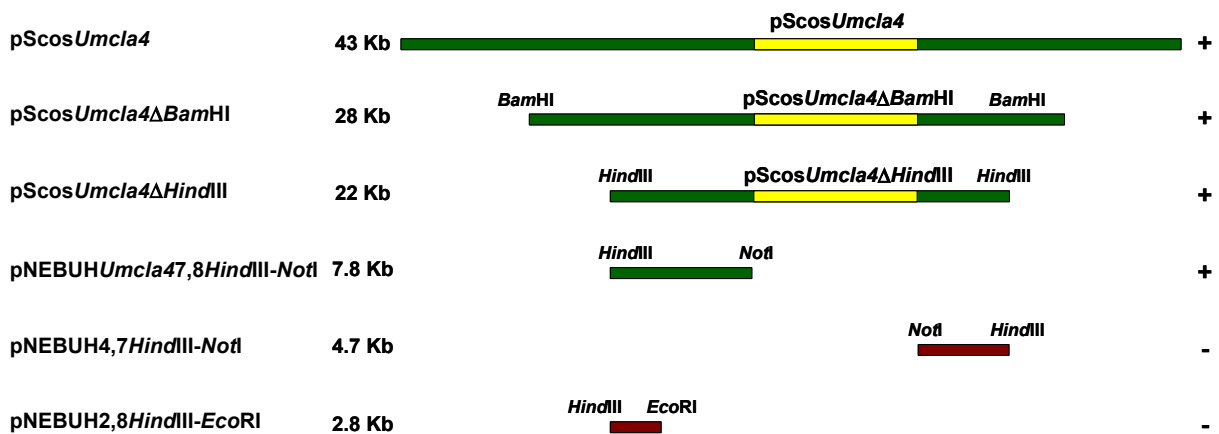


Abbildung 46: Klonierungsstrategie des komplementierenden 43 kb pScos*Umcla4* Cosmids und Komplementationsversuche mit den Subklonen. Das komplementierende pScos*Umcla4* Cosmid wurde mit *Bam*HI geschnitten und das größte, etwa 28 kb Fragment wurde religiert. Ein religiertes 22 kb große *Hind*III Fragment des pScos*Umcla4*Δ*Bam*HI Cosmids (pScos*Umcla4*Δ*Hind*III) komplementiert die *cla4* Mutante und wurde mit den *Hind*III/*Not*I Restriktionsenzymen weiter subkloniert. Von den zwei in pNEBUH klonierten Fragmenten komplementierte nur das 7,8 kb Fragment enthaltende pNEBUH7,8*Hind*III-*Not*I Plasmid.

Durch weitere Subklonierung wurde das *cla4*-Gen auf einem 7,8 kb *HindIII*-*NotI*-Fragment eingegrenzt. Das pNEBUHUm*cla4*-7,8*HindIII*-*NotI* Plasmid komplementierte die Mutation in der *cla4* Mutante (**Abbildung 46**) und wurde daher für weitere Subklonierungen und Sequenzierungen verwendet.

Nach der Sequenzierung der Subklone stellte sich heraus, dass sich auf dem komplementierenden 7,8 kb *HindIII*-*NotI* Fragment ein durchgehender ORF mit 2484 Basenpaaren befand, der für ein Protein mit 826 Aminosäuren kodierte. Das Protein zeigte im Vergleich mit bekannten Proteinsequenzen eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu der Ste20 Kinase aus *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* und zu Cla4 Proteinkinase aus verschiedenen Organismen auf. Die Sequenzierung zeigte hinter dem *cla4* Gen keine Homologien zu anderen bekannten Sequenzen. Auf dem 5'-Ende des 2,8 kb *HindIII*-*EcoRI* Fragments wurden Sequenzübereinstimmungen mit dem N-Terminus eines unbekannten *Oryza sativa* Proteins mit Ähnlichkeiten zu Methyltransferasen gefunden (8e-24).

Der durchgehende offene Leserahmen, der für die Komplementation der Mutation in der *cla4* Mutante verantwortlich war, wurde *cla4* genannt. Das Gen enthielt kein Intron und die abgeleitete Aminosäuresequenz ergab ein eher hydrophiles Protein mit einem Molekulargewicht von 88 kDa. Die DNA- und Proteinsequenz ist in der **Abbildung 47** dargestellt.

Mit Hilfe eines Domänensuchprogramms (NCBI Conserved Domain Search) wurden in der Cla4 Aminosäuresequenz die folgenden Domänen gefunden: Eine C-terminale Kinase Domäne (Position 553 bis 805), eine CRIB Domäne für die Interaktion mit der kleinen GTPase Cdc42 (203 bis 261) und eine PH Domäne (105 bis 194), die für die Membranbindung verantwortlich ist (**Abbildung 47**).

Das UmCla4 Protein zeigt die höchste Sequenzähnlichkeit mit der aus 644 Aminosäuren bestehenden Ste20 alpha Kinase von *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (KD: e-133), die sich in dem MAT α Locus dieses humanpathogenen Pilzes befindet und für die Pheromonantwort und Kreuzung verantwortlich ist (Lengeler et al., 2000). Andere verwandte Proteine sind die Cla4 Kinase von *Candida albicans* (KD: e-108) (Leberer et al., 1997b), *Saccharomyces cerevisiae* (KD: e-96) (Cvrckova et al., 1995), *Ashbia gossypii* (KD: e-99) (Ayad-Durieux et al., 2000) und *Yarrowia lipolytica* (KD: e-117) (Szabo, 2001), das Cla4 Homolog Skh2 in *Schizosaccharomyces pombe* (KD: e-100) (Yang et al., 1998) und die

Chm1 Kinase in *Magnaporthe grisea* (KD: e-116) (nicht publiziert) (**Abbildung 48**). Die höchste Homologie findet man dabei jeweils in der Kinase Domäne. Die Cla4 Proteine und ihre nächsten Homologen enthalten in jedem Fall eine PH Domäne, und unterscheiden sich damit von den Ste20 Kinasen der p21-aktivierten Kinasen (PAK, p21-activated kinase), bei denen keine PH-Domäne vorhanden ist. Die Mitglieder der verwandten Germinal Center Kinase (GCK) Subfamilie, zu der auch die Don3-Kinase gehört, tragen nur eine sehr ähnliche Kinasedomäne, die sich jedoch am N-Terminus befindet.

```
1  ATGTCGTGGCTTTCGTGGCAGCTCAAATGGCCCCGAAGCGCGCCACAAGGAGGTCCTTTGGCTCCTTGACACCATCACGACAGCGCCGCGGTTCCGT 100
    M S G F R G T S N G P Q G A P Q G G S F G S L T P S R P A P P V P

101 CGAGCAAGCACAACGATCCCTCCTGCCACCACTCTCCAGTACAATGCAGCTTCTGCGGGTATGGGCGTGGCGGTGGCTCTTACACGGTCCACTCCG 200
    S S K H N D P F L P P L S Q Y N A A S A G M G A G G G S Y T G P L R

201 CCCTGCTGGTCCGGGTGCCACCGCCTCTTCTGGAGCCCCAGCCAAACATCTCGCCGGCAACAATTCCGGCTGGCAGCAGGCCGTCCTCAATGCCACCACC 300
    P A G P G A T A S S G A P A N H L A G N N S G W Q Q A G P N A T T

301 AGCGGCGTGTCTGTTGTGAGGAAAGCTGGGTCAAGCTCAAGGAAGACGGCATTGCTCTTGGATCTGGAGCAACGTTGGCTCGCGCTCCGCGAGCAGA 400
    S G A A V V R K G W V S V K E D G I R S W I W S K R W L A L R E Q

401 CGCTCACCTTTTACAAGAACGAGACCACTACCAAGCCGTTGCCCTCGTTTTCTCAAAGATATTTCCAATGTCTCGCGTACCGCATCTCAAGCCGTACTG 500
    T L T F H K N E T T Y Q A V A L V F L K D I S N V S R T D L K P Y C

501 CATCGAGGTGAGACCAAGGAAAAAGACTTTTTACTTGCAGCTCAAGAGCGACGAAGAACTCTATGGCTGGATGGACGACATCTACTCTCGCTCGCCGCTC 600
    I E V E T K E K T F Y L Q L K S D E E L Y G W M D D I Y S R S P L

601 ATGGGCGTCTCTTCAACCACTTGTGTCACGAGTTGATGTCGGCTTTGATCCCATCAGTGGAGCCTTCAACGGTCTGCCCGAGCAATGGTCCAAG 700
    M G V S S P T N F V H Q V H V G F D P I S G A F T G L P E Q W S K

701 TGCTCACAACTCGGCCATCACGCGGAGGACTATGAAAGAACCCTCAGGCTGTGCTCGATGTGCTTGAATTTACACCGACATTCAGAAGCGCGAGCG 800
    L L T T S A I T R E D Y E K N P Q A V L D V L E F Y T D I Q K R E R

801 TGACGACTTTGGCTTGGCAGCCTACCATGAATGTCCAGGCTGGACGCAAGCCCAAGAGATCCCGAGCGCTTCTTCGCGCCCGGCTTCAAAGCTGG 900
    D D F G L G T P T M N V Q A G R K P N E I P S A S S A P R F K A G

901 ACGGGCTTTGCGGAAGTGTGGAGCGGACTCGGCATCGAATTTGAGCAAAGATGCGCCTCAATATCCCGCTGCGTCCAAACCTCCTTCGGACGCTTTC 1000
    T G F A G S A G A D S A S N L S K D A P Q Y P A A S K P P S D A F

1001 GAAGTCGTCGCGTGGCCTGCATCGTCTGAGCGCGTCTTCTGTTGAGACCGCGCAGCGCTGCCATGACAAGCGACCCCTCGGATGACGGTCGACAAG 1100
    R S S S A A A A S S S S A S S L R P A Q P A M T R R P S D D G R Q G

1101 CGCATCCAGCCCGGCTTGTCTCAGGCGTCTCATCCCGCTCGGTGGCTCCAAGATTCCAAGTACGTTCGCGCCACACCTAGTTCCAGTGCCTGCGCT 1200
    A S S P A L S Q A S S S R L G G S N D S K Y V R A T P S S S A S P

1201 GCCAAGCATACCAAGATCTGGTGCCTTCGCGCAAGGCGCCACCGCTCCCGGCTGTGTAAGCCTCCGACCCCATCGTCATCACTGGGCTCTACCCGAC 1300
    A N A Y Q D L V P S R K A P T A P G S V K P P T P S S L A S T R

1301 CCGCACCGCGCTCCCAACTCGTCGACGCTTCTAGCCGAACGCGCAACGACGCGGTGTGACGGGTCTCAACGTCAAGACCAAGGAGCTCAAAGTGG 1400
    P A P P P P N S S T P S S R T A N D A G V Q G L N V K T K E L K L G

1401 AAGCGACTCTTCTCTGTCTTCGGCATCGACCACTGGTGTGCCAAGCTGCCACTGTGCCAAGCAACCTTCGCGAGTCCGCGCAGCAACAAATGCGGCT 1500
    S D S S S A S A S T T G A A K A A T V A K Q P S P V A A A P N A A

1501 GCAGTGCACCGGTCAAACCGTTGCAGATGGCCAAAAAGGAGACAAACGCAAGACTGCGCAACAAAAAGAGCGGAGCGCGTATCAGCACCATGTCTG 1600
    A A A P V K P L Q M A K K E T N A K T A Q Q K E A E R R I S T M S

1601 AGGCGCAGATCATGGACAACGTGCGCTCAGTGGTGAGCCAGGACGATCCCAATATGCTGTACAGCAAGATCAAAAAGGTGGGCCAGGCTGCTCGGGATC 1700
    E A Q I M D N V R S V V S Q D D P N M L Y S K I K K V G G A A S G S

1701 TGATTCTGGCCAAAGACGCTCGCCACGGGTCAACGTGTAGCGATCAAGACGATGGACCTTTCTCAGCAGCCACGTAAGGAACATCATCGTCAACGAGATT 1800
    V F V A K T L A T G Q R V A I K T M D L S Q Q P R K E L I V N E I

1801 CTTGTATGAAGAGTCGAACACCCCAACATTGTCAACTTCCTCAACTCGTTCCTGGTGGCGCAACAACGAGCTGTGGGTATCATGAGGTATACATGGAGG 1900
    L V M K E S Q H P N I V N F L N S F L V R N N E L W V I M E Y M E

1901 GAGGTGCACCTTACCGATGTGATTGATAACAACACGCTCGAGGAGGATCAAATTGCTGCCATCTGCCTCAGACGTGCAAAAGGTCTGGAGCACCTGCACAG 2000
    G G A L T D V I D N N T L E E D Q I A A I C L E T C K G L E H L H S

2001 CCAGAGCATCATCACCGTGATATCAAGTCCGACAATGTGCTGCTCAACGCGCAGCGGCCAGGTGAAGATCACTGATTTCGGTTTCTGCGCTAAGCTGACG 2100
    Q S I I H R D I K S D N V L L N A S G Q V K I T D F G F C A K L T

2101 GATCAGAAGTCGAAACGTGTACGATGGTGGGCATCCATATTGGATGGCTCCCGAGGTGGTCAAGCAGAAAGAGTACGGAGCCAAAGTTCGACATTTGGA 2200
    D Q K S K R A T M V G T P Y W M A P E V V K Q K E Y G A K V D I W

2201 GTTTAGGCATCATGGCCATTGAGATGATTGAGAAGAGCCGCTTACTTGGATGAAGAGCGGCTCAAGGCGCTGTACCTGATCGCCACCAACCGGACGCC 2300
    S L G I M A I E M I E N E P P Y L D E E P L K A L Y L I A T N G T P

2301 GACGCTTAAGAAGCCGAGACGTTGTCCAAGAACCCTCAAGAGCTTCTTGGCCGTTTGTGTTGTGCTGACGTCAAGAGCCGTGCTTCGCTGACGAGCTG 2400
    T L K K P E T L S K N L K S F L A V C L C A D V K S R A S A D E L

2401 CTTCAACATCCCTTCTGCAATCGGCTTGTCCGCTGTGAGCGCTCGCGCGTGTCTCCGCTTCCGCAACAAGCCGATCGTTGA 2484
    L H H P F L Q S A C P L S S L A P L L R F R N K P D R *
```

Abbildung 47: *Umcl4* DNA- und Proteinsequenz. In der Proteinsequenz zeigt die Farbe gelb die Pleckstrin Homologie (PH) Domäne, mit blau ist die CRIB-Domäne gezeichnet und die Kinase Domäne ist rot gefärbt.

<i>U. maydis</i> Cla4	1	MSGFRGTSGNGPQGAPQGGSFSGSLTFSRFPAPPVPSSKHNDPFLPPLSQYNAAASAGMGAGGG	60
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	1	-----MAFSP-----SLTPSRPAP-----VPPRRAAVTAPSLILRVTDG	33
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	1	-----MSLSAAAN-----KISDNDQFQIGPAPRPPSSN	28
<i>A. gossypii</i> Cla4	1	-----MSLSAAAR-----ELSESDFDQIGPAPKPPF--	26
<i>U. maydis</i> Cla4	61	SYTGPLRPAGPGTASSGAPANHLAGNNSGWOQAGPNATISGAAVVKGWVSVKEDGIRS	120
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	33	-----AAAPQSNFSSTYSYSPFSYTNSSICSTKLVDITR-SRTIISGAASIKKEEGIRA	85
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	28	-----SQGRTCYNQIQPITIKLSQLDLTSAS-HLGTSTIS---KKASGWVSVKDDGILS	77
<i>A. gossypii</i> Cla4	26	-----VAYNCTKPLVNYMSQMDLGAISGGKMRVQ---RKASGWVSVKDDGILS	72
<i>U. maydis</i> Cla4	121	FWWSKRMLAIREQTLTFHKNETTYQ-AVALVFLKDISNVSRITDLKPYCIEIVET-----	172
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	86	FWWSKRMLVIGSAELRTIYKNENSPS-FVYTVSLEDIQDVIRVDMKPYCIEIVET-----	137
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	78	FWWQKRMLVLDHDSYVALYKNDKQNDDAILKIPLTSLISVSRITQLKQYCFELVRCSDRNSV	137
<i>A. gossypii</i> Cla4	73	FWWQKRMLVLDNLYLSLYKDSGREDVAVQLPLTSLISVSRNOLKQYCFELVRSSDRSGA	132
<i>U. maydis</i> Cla4	172	-----K-EKTFYLLQLKSDLELYGMDDTYSRSPILMG-VSSPTNFVHVOHVHG	216
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	137	-----G-DKLYEAFRSDNEVYGMDDIYSRSPRLG-VSPPTNFVHVOHVHG	181
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	138	SSGSSSSSLNVSSDSNSKSIYHATKTESDLHSMIDAFKACPLLSGVSSPTNFTHKHVHG	197
<i>A. gossypii</i> Cla4	133	PAAG-----AGGDSSKKSVFIATKTELDLEHTWLDSTESKCPLLISGVSSPTNFTHKHVHG	186
<i>U. maydis</i> Cla4	217	FDEISGAFTGLPEQWSKLLTTSALTREDYEKNPQAVLDVLEFYTDIQKRERDDFGLGTPT	276
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	182	FDPKSGGFTGLPPQWSKLLTSSAITKEEAARNPEAVLDVLFQFYTCQAG-----	230
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	198	FDEPETSFVGMPTFNWEKLLKHSRITSEDWNNNSAAVQLVLFQFYQYNGA-----GNP	249
<i>A. gossypii</i> Cla4	187	FDEPETSFVGMPTFNWEKLLKHSRITSEDWNNNSAAVQLVLFQFYQYNGA-----TAT	238
<i>U. maydis</i> Cla4	277	MNVQAGRKPNEIFSSASSAPRFKAGTGFAGSAGADSSANLSKDAPOYPAAKPPPSDAFRSS	336
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	230	-NVLEGYQQFPVETVSNQS-LITGTIAATRFKVG-----LGGQQQQQOOLQSV	276
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	250	TNTLDKPOSGETSSSQSLPNSYNDNKLNNNSVNSK-----SSSGVSSSMVSVORKTSQP	303
<i>A. gossypii</i> Cla4	239	PTAQAAAQAAGAPGRFPMLTLSSNSQASMQQIAS-----TPPYSGGEMIPORKAFTP	291
<i>U. maydis</i> Cla4	337	S-AAAASSSSASSLRPAQPMTRRPSDDGR-----Q-----GASSPALSOASSRILG	382
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	277	P-FTAPESLEATTVPVVRPSEDFTEEN-----TLAQ-----	305
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	304	PNTKSPVSLGSLPPEINTKLPISQSNIPRHLQNVNPQYQPKMRNGHSPFNGQFPRGPMH	363
<i>A. gossypii</i> Cla4	292	P--KPVVTSGS-----AIPSAKG-----GPNVGVTTSPSVH	320
<i>U. maydis</i> Cla4	383	GSNDSKYVATPSSSSASPANAYQDLVPSRKAPT---APALSRLRPHR-HHCLYPTRFAA-	437
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	305	-----	305
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	364	PNNRSRSLQQQQQQQKQKQHQYQYHHQGPSFSPSPSPSPPLNYPYRPHNMNINPYKQP	423
<i>A. gossypii</i> Cla4	321	HQNTQHKKQSQPTQSGPPKSLPPLHRDEEGPTAPLGNSVSVATKESPTERLLNNLSET-	379
<i>U. maydis</i> Cla4	437	-SLVDAFPNGQRRRCRVFNVTKEKLGSDSSASASTTGAAKAA-TVAKQSPSPAAA	495
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	305	-----KEKEKILN-----S-----QHQMESV	322
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	424	QSPSSSQSTQNQAIPRYAQ-NSSPTAHFQFQRTAP-KPPIASAPRAP--YPSNQNTATSNT	479
<i>A. gossypii</i> Cla4	379	-SLMQQLPAKPVAPPSSV-GPVAPPLRLQFQRVAPGRPAQGPAPHADPTRGGPNAMKQQ	437
<i>U. maydis</i> Cla4	496	PNAAAAPV-----KPLQMAKKETNAKTAQQKEAERR---ISTMSBAOIMDKLRSVVSQ	546
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	323	SRFAMAK-----SDKEK-VTWSEPGTMEKR---ISTMNEVOIMEKLRVVSRA	365
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	480	HVQFVAPKNDQSTPQTMRAQKRPDADVAQPGGVAKPKKPARPTMSHAPIMSKLKKVTN	539
<i>A. gossypii</i> Cla4	438	HGNPAAASG-----QLGPDSSKPEGAPGHPATAVAKKKAGRPTMSNAEIMTILAAVTFN	491
<i>U. maydis</i> Cla4	547	DDENMLYSKIKKVGQGASGSVFVAKTLAT-----GQVIAKTMIDLS	587
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	366	KDPSQLYSKIRKVGQGASGMVFVAKTLN-----GKKVAIKQMIDLS	406
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	540	ADPSQCFKVIKAGQGASGSVYLAEARTHIPTESNMIELINNDIDEPHVGDKVAIKQMVLS	599
<i>A. gossypii</i> Cla4	492	TDPSPFQMTEKAGQGASGSVYLAORLKIIPPYDENSQVSGHELND-NIGKVAIKQMILS	550
<i>U. maydis</i> Cla4	588	QQPRKELIVNEILVMKESQHPNIVNFINSELVVRNNELWVIMEYMEGALTDVIENN----	643
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	407	QQPRKELIVNEILVMKESQHPNIVNFINSELVVRNNELWVIMEYMEGALTDVIENN----	462
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	600	QQPRKELIVNEILVMKESRHKNIIVNFEALRLTDDLLWVMEIMEGGSLLTDLIENSPNTD	659
<i>A. gossypii</i> Cla4	551	QQPRKELIVNEILVMKESQHKNIIVNFEALRLKTEDDLWVMEIMEGGSLLTDVIENSGSD	610
<i>U. maydis</i> Cla4	643	--T--LEEDQIAATCLETGGLHLSQSIIHRDIKSDNVLLNASGVKITDFGFCAKLT	699
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	462	--K--LEENQIAATCLETGGLHLSRSIIHRDIKSDNLEMTQGVKITDFGFCAKLT	518
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	660	NSHSPLTEPQIAIVIVRETCGLKFLHDKHIIHRDIKSDNVLLDTRAVKITDFGFCAKLT	719
<i>A. gossypii</i> Cla4	611	ASESPITEPQIAIVIVRETCGLKFLHDKHIIHRDIKSDNVLLDTHGRVKITDFGFCAKLT	670
<i>U. maydis</i> Cla4	700	DQSKRATMVGTPIYWMAPVVKQREYGAQVDIWSLGIMATMIENEPYPYLDEEPLKALYL	759
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	519	DQSKRATMVGTPIYWMAPVVKQREYGAQVDIWSLGIMATMIENEPYPYLDEEPLKALYL	578
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	720	DKRSKRATMVGTPIYWMAPVVKQREYDEKEDVWSLGIMTMIENEPYPYLDEEPLKALYL	779
<i>A. gossypii</i> Cla4	671	DKRSKRATMVGTPIYWMAPVVKQREYDEKEDVWSLGIMTMIENEPYPYLDEEPLKALYL	730
<i>U. maydis</i> Cla4	760	IATNGTPTLKKPBTLSKNLSFIAVCLCADVKSRSASADELLHHEFLISACPLSLAPFLR	819
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	579	IATNGTPTLKSPEKLSODLKHFLSVCLCVDVVRASSTELLKHHEFLQIACSVRLAPFLR	638
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	780	IATNGTPTLKHHPBSLSLEIKRFLSVCLCVDVVRASSTELLHHEGFFNMADPKDLTSLLE	839
<i>A. gossypii</i> Cla4	731	IATNGTPTLKHHPBSLSLEIKRFLSVCLCVDVVRASSTELLHHSFFITSCPEPLANLLK	790
<i>U. maydis</i> Cla4	820	FRNKPD	826
<i>F. neoformans</i> Ste20 alpha	639	FKGGTL	644
<i>S. cerevisiae</i> Cla4	840	KK	842
<i>A. gossypii</i> Cla4	791	KK	793

Abbildung 48: Vergleich der Proteinsequenz mit den nächsten UmCla4 Homologen.

Die schwarz markierten Sequenzen bedeuten identische, die lila markierten ähnliche Aminosäuren. In der Kinase Domäne sind die Subdomänen mit römischen Zahlen gekennzeichnet.

18.2. Die Mutationsanalyse des *cla4*⁻ Genes weist auf eine Mutation in der Kinase Domäne hin

UV-Bestrahlung verursacht meistens Punktmutationen im Genom eines Organismus, die insbesondere durch die Bildung von Thymindimeren hervorgerufen werden. Um den für die Mutation verantwortlichen Basenaustausch in dem *cla4* Gen zu finden, wurde im ersten Schritt die Kinase Domäne sequenziert. Dazu wurde genomische DNA aus der *cla4* Mutante und aus dem Ausgangs-Stamm BUB8 isoliert. Mittels PCR wurde die Kinasedomäne von *cla4* mit den Primern MB303 und MB304 amplifiziert. Das so entstandene etwa 1 kb lange Fragment wurde in den Vektor pCR TOPO Vektor kloniert (**Abbildung 49**). Anschließend wurden sowohl für das aus der Mutante und dem Wildtyp erzeugte Fragment mehrere unabhängige Klone sequenziert.

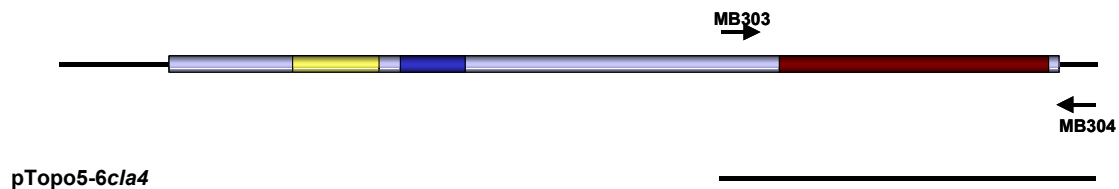


Abbildung 49: Mutationssuche im *cla4*⁻ Allel. Die Kinase Domäne des *cla4*⁻ Allels in der *cla4* Mutante und das Wildtyp *cla4* Allel des BUB8 Wildtyp-Stammes wurde mittels PCR amplifiziert. Das entstandene 1 kb lange Fragment wurde in den pCR TOPO Vektor kloniert und mehrere unabhängige Klone wurden für die Sequenzierung verwendet.

Durch die Sequenzierung der Klone konnte in dem *cla4*-Allel ein Basenaustausch identifiziert werden. Der Austausch betraf das Thymin an der Position 1910, an dessen Stelle ein Cytosin und so anstatt des Kodon-Tripletts CTT, das für die Aminosäure Leucin kodiert, das Codon CCT für Prolin eingebaut wurde (**Abbildung 50**). Die vom Austausch betroffene Aminosäure Leucin⁶³⁷ befindet sich innerhalb der Kinasedomäne in der hochkonservierten Region der Subdomäne V, die strukturell zur ATP-Bindetasche gehört (**Abbildung 51**).

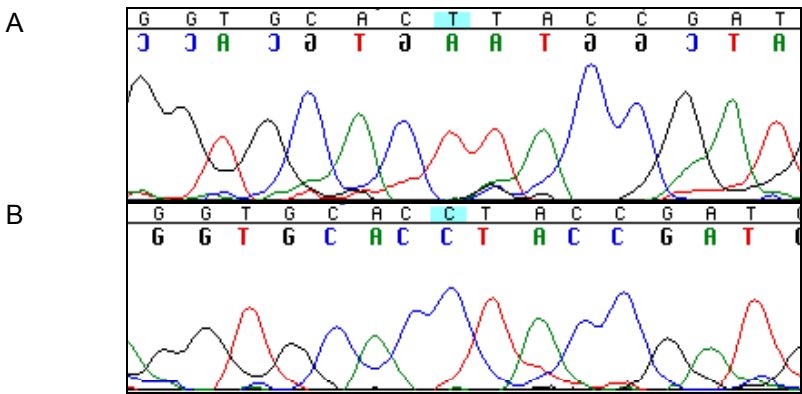


Abbildung 50: Sequenzvergleich des *cla4* Allels im Wildtyp und in der *cla4* Mutante. (A) Sequenzausschnitt des Wildtyp Allels von *cla4* sequenziert in reverse Richtung **(B)** Das Mutation tragende *cla4*⁻ Allel in der *cla4* Mutante, sequenziert in forward Richtung

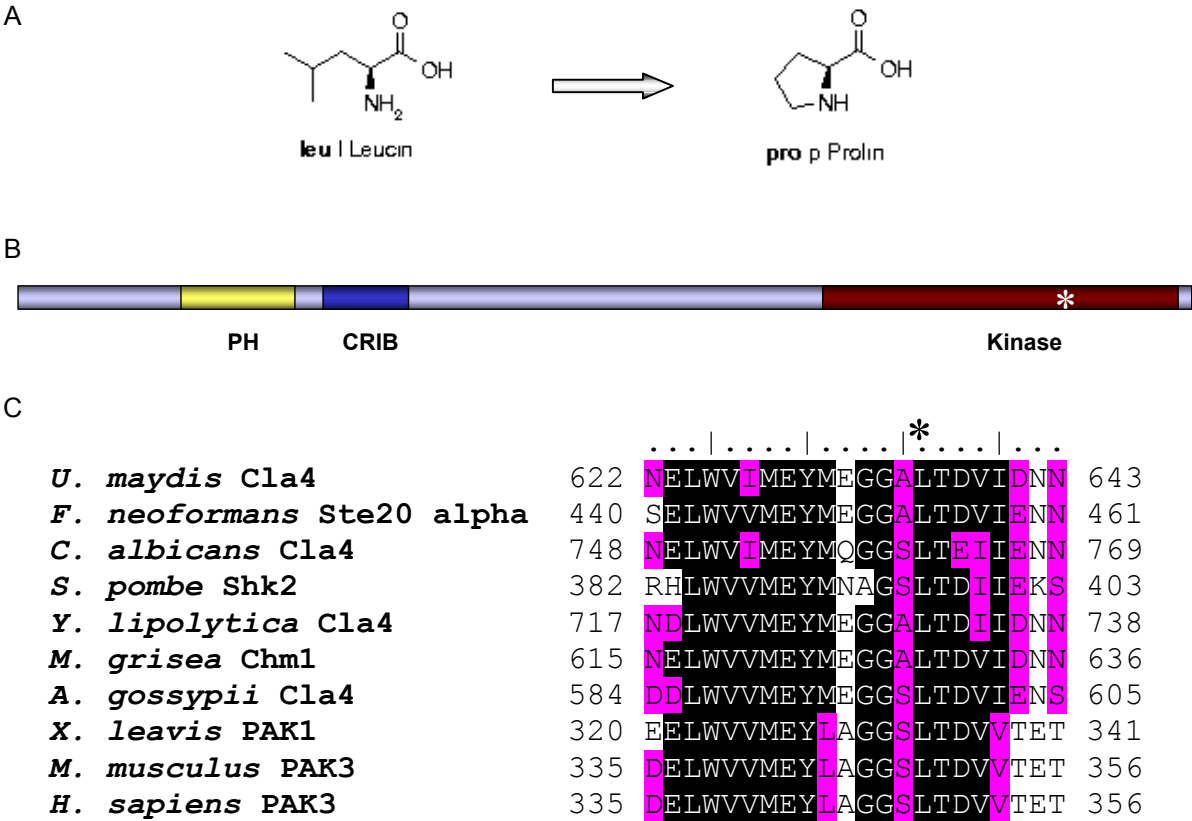


Abbildung 51: Mutationsanalyse des *cla4* Genes. (A) Der Basenaustausch im *cla4*⁻ Gen führte zu einem Austausch von Leucin zu Prolin in der Proteinsequenz. **(B)** Die L637P Mutation befindet sich in der Subdomäne V der Kinase Domäne des Cla4 Proteines **(C)** in einer hochkonservierten Region.

Um sicherzustellen, dass die L637P Mutation zur Entstehung des *cla4*-Phänotypes führte, muss die C1910T Punktmutation in das Wildtyp-Allel von *cla4* wiedereingeführt werden.

Wenn diese Mutation für den Phänotyp verantwortlich ist, kann nach der Wiedereinführung der Mutation der gleiche Phänotyp beobachtet werden. Dieses Experiment konnte aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

18.3. Überexpression des Cla4 Proteins in Wildtyp-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Überexpression des Cla4 Proteins zu einer morphologischen Änderung, eventuell zu Letalität führt, wurden Wildtyp-Zellen nach der Transformation mit dem pRU11 Δ NotI-Umcla4-GFP Konstrukt mikroskopisch untersucht. Das *cla4* Gen wurde unter die Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors exprimiert, und die Transformanten wurden über Nacht in Arabinose-haltigem Medium inkubiert, was zu einer Überexpression des Cla4 Proteins führte.

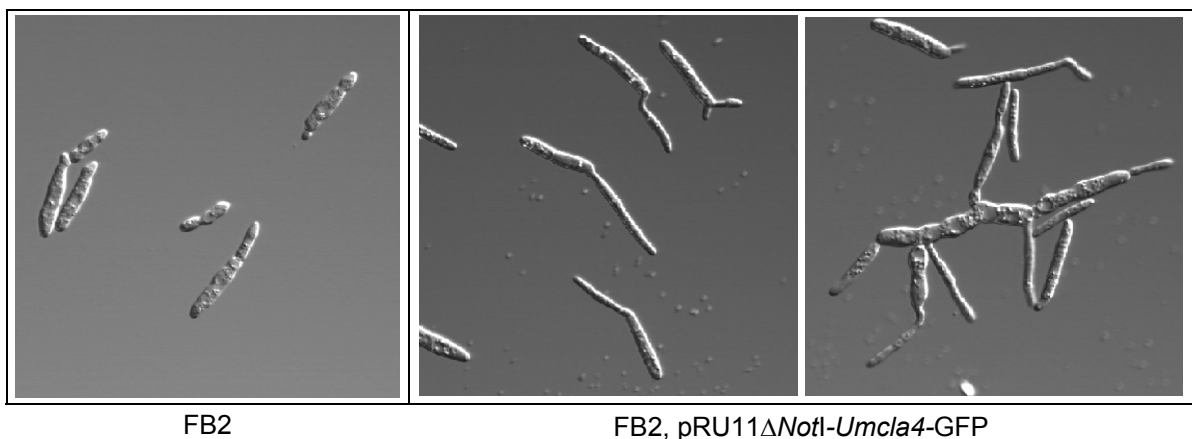


Abbildung 52: Überexpression des Cla4 Proteins in Wildtyp-Zellen. FB2 Wildtyp-Zellen zeigten dickere und kürzere Morphologie als Wildtyp-Zellen, die das Cla4-Protein überexprimierten. Induzierte Zellen bildeten verlängerte, dünne Knospen und in mehreren Fällen zusammenbleibende Zellstrukturen, in denen die Tochterzellen ebenfalls langgestreckt waren.

Im Gegensatz zu uninduzierten Wildtyp-Zellen konnte bei den Transformanten beobachtet werden, dass die Mutterzellen und ihre Knospen im Durchmesser dünner waren und sie langgestreckt wuchsen. Nach der Induktion konnten auch zusammenbleibende Zellstrukturen beobachtet werden, die ihre Knospen ebenfalls dünn und lang gestreckt bildeten und die in den Wildtyp-Kulturen nicht zu sehen waren (**Abbildung 52**). Diese langgestreckte Zellmorphologie erinnerte an die von Wildtyp-Zellen, die unter der Kontrolle des *crg*-Promotors die konstitutiv aktive Variante des Cdc42 Proteins (Cdc42^{Q61L}) exprimierten. In

beiden Fällen wies diese verlängerte Morphologie auf eine Veränderung des polarisierten Wachstums hin.

19. Cla4 wird für die Regulation der Zellpolarität benötigt

Um mehr über die Rolle des Cla4 Proteins im Zellzyklus zu erfahren, wurde die *cla4* Mutante zellbiologisch untersucht. Es wurde getestet, ob kompatible *cla4* Zellen fähig sind, Pheromon zu erkennen und zu produzieren. Außerdem wurden die Septen in den *cla4*-Zellen durch elektronenmikroskopische Aufnahmen näher charakterisiert und die Interaktion mit anderen an der Zellteilung beteiligten Proteinen durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Das Kreuzungsverhalten einiger *don*-ähnlicher Mutanten wurde mit dem von Snetselaar *et al.* (1996) beschrieben. Durch diesen Test kann bestimmt werden, ob die Zellen in der Lage sind, Pheromon zu sezernieren und ob sie als Antwort auf Pheromon Konjugationsschläuche ausbilden. Es wurden folgende Kombinationen bei RT über Nacht inkubiert: BUB8 (*a2 b4*) x FB1 (*a1 b1*), *don5* x *don5*, *cla4* x *cla4* (**Abbildung 53**).

Die Kreuzungen zeigten, dass kompatible Wildtyp-Zellen (BUB8 x FB1) innerhalb dieser Zeit Konjugationsschläuche bildeten und miteinander fusionierten (**Abbildung 53, A**). Zellen mit dem Kreuzungstyp *a1b1* wiesen kürzere Konjugationsschläuche auf, wie dies auch bereits von Snetselaar *et al.* (1996) schon beschrieben wurde. Im Falle kompatibler Kreuzungen der *don5* Zellen konnten lange, dünne Zellen beobachtet werden, die zwar von beiden Seiten aufeinander zu wuchsen, dann jedoch aneinander vorbeizuwachsen schienen. An diesen Zellen konnten häufig Seitenknospen beobachtet werden, was der Struktur einen verzweigten Phänotyp gab, wie er auch oft bei Nährstoffmangel auftritt (**Abbildung 53, B**). In der *cla4* x *cla4* Kreuzung wurden nur wenige Konjugationsschläuche gebildet, die aufeinander zu wuchsen. (**Abbildung 53, C**). Die Bildung der Schläuche nahm jedoch längere Zeit in Anspruch als im Falle der Wildtyp-Kreuzung, was vermutlich auf das verlangsamte Wachstum der *cla4* Zellen zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse zeigten, dass die *don5* Mutante eventuell Schwierigkeiten bei der Erkennung von Pheromonen oder bei der Weiterleitung des Pheromonsignals haben könnte, die *cla4* Mutante ist aber in der Pheromonerkennung nicht betroffen.

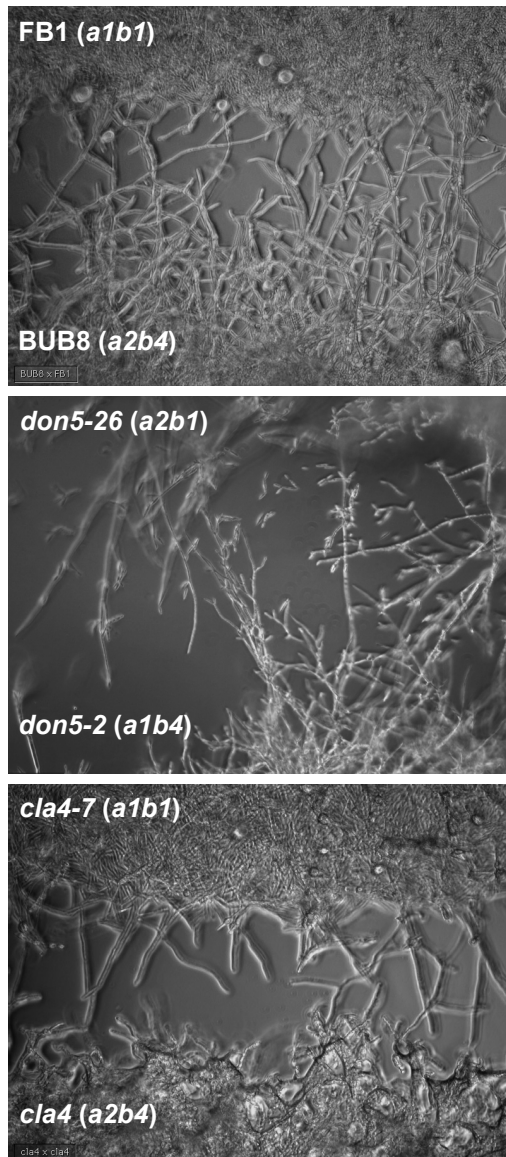


Abbildung 53: Konfrontations-assay der *don5* und *cla4* Mutanten.

0,5 µl der kompatiblen Stämme wurden auf 1% Wasseragar in einem Abstand von etwa 200 nm voneinander aufgetropft und mit Paraffin beschichtet. Die Kreuzungen wurden nach 24 Stunden fotografiert. **(A)** Nach dieser Zeit konnten in der Wildtyp-Kreuzung (BUB8 x FB1) aufeinander zuwachsende und dann fusionierende Zellen und gebildete Konjugations-schläuche beobachtet werden. **(B)** Die kompatible Kreuzung der *don5* Mutante wies nach dieser Zeit nur aneinander vorbeiwachsende Zellen auf, Konjugationsschläuche waren nicht zu sehen. Die Zellen bildeten an ihren Seiten Verzweigungen und waren ganz dünn und lang, was eher an den Phänotyp bei Nährstoffmangel erinnert. **(C)** Die Schlauchbildung bei der *cla4* Mutante lief langsamer als bei Wildtyp-Zellen ab, was wahrscheinlich auf das verlangsamte Wachstum der Mutante zurückgeführt werden kann.

19.1. *cla4* Zellen sind einfach septiert

Um mehr über die Septierung in der *cla4* Mutante zu erfahren, wurden die Zellen elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurden *cla4* Zellen fixiert, und mittels eines Cryotrom bei -120°C geschnitten. Die Schnitte wurden mit Uranyl-Acetat kontrastiert und im Rahmen eines EMBO Kurses elektronenmikroskopisch untersucht (**Abbildung 54**).

Auf dem Bild ist zu erkennen, dass die in den *cla4*-Zellen keine abgeschnürten Knospenstrukturen zu erkennen sind, sondern die Septen sich über die ganze Zellenbreite erstrecken. Zwischen zwei Zellen befindet sich jeweils ein einfaches Septum, das einen dreischichtigen Aufbau aufweist, und dem primären Septum der Wildtyp-Zellen ähnelt. Die Zellen enthalten mehrere große Vakuolen, die hauptsächlich asymmetrisch an den beiden

Seiten des Septums liegen. Diese erinnern aber nicht an die Membranakkumulationen, die in Wildtyp-Zellen die Fragmentierungszone zwischen dem primären und sekundären Septum bilden. Diese Daten weisen darauf hin, dass diese Form der Septierung in der *cla4* Mutante unabhängig von der Septierung während der Knospenbildung auftritt und mehr der Septenbildung in dikaryotischen Hyphen oder der Querseptierung entspricht, die man in zellzyklusarretierten haploiden Zellen beobachtet.

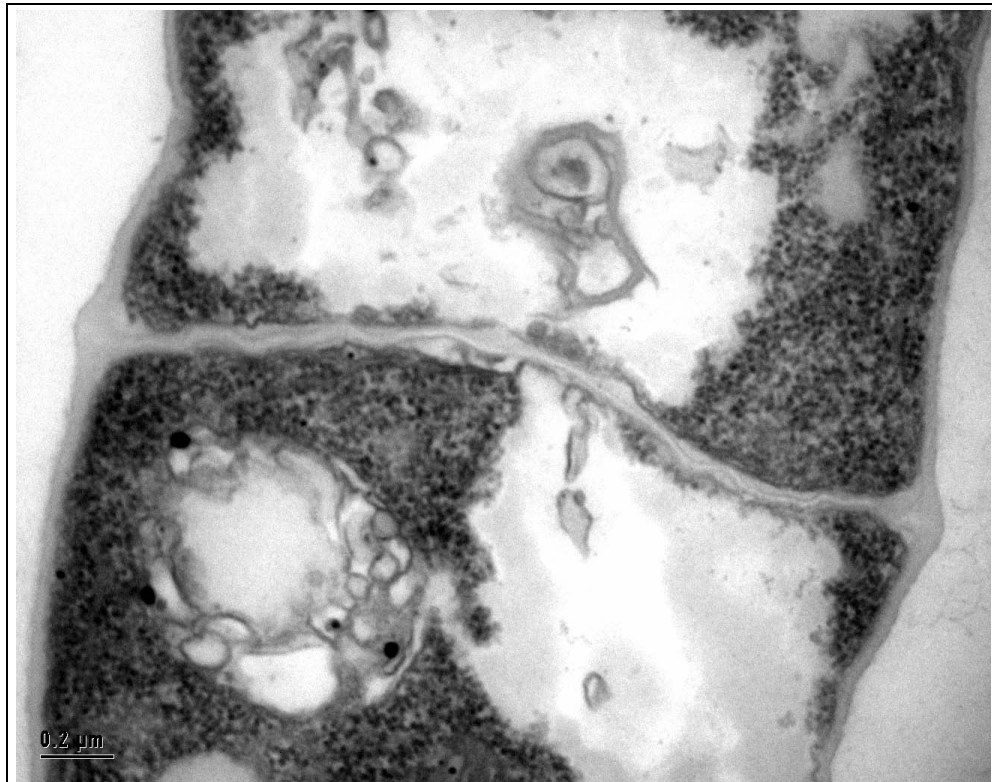


Abbildung 54: EM Aufnahme der Septumregion in der *cla4* Mutante. *cla4*-Zellen weisen ein einfaches Septum auf, an dessen Seiten sich Vakuolen befinden.

19.2. Lokalisierung des Cla4 Proteins in haploiden und dikaryotischen Zellen

Um zu erfahren, wo das Cla4 Protein in der Zelle während des Zellzyklus lokalisiert, wurde ein Cla4-GFP Fusionsprotein hergestellt, indem das *U. maydis cla4* Gen hinter den konstitutiv aktiven etef-Promotor gesetzt und C-terminal mit *egfp* fusioniert wurde (**Abbildung 55**). Das Konstrukt (p123Umcla4GFP) wurde in BUB8 und FB1 Wildtyp-Zellen transformiert. Es wurden jeweils mehrere unabhängige Transformanten mikroskopisch untersucht. Das Cla4-GFP-Signal war in haploiden Zellen an der Stelle der zukünftigen Knospenbildung zu sehen (**Abbildung 56, A**), in knospenden Zellen wurde das Protein an der Spitze der Tochterzelle

gefunden (**Abbildung 56, B**) und kurz vor der Septumbildung war Cla4 an dem Mutter-Tochter-Hals zu beobachten (**Abbildung 56, C**). Die Lokalisierung des Cla4 Proteins wurde außer in haploiden Zellen auch in dikaryotischen Luftmyzelien untersucht, die bei der Fusion kompatibler Zellen entstehen. Zu der Fusion wurden die Kreuzungen BUB8 x FB1*Umcla4*-GFP und BUB8*cla4* x FB1*Umcla4*GFP verwendet. Obwohl der Wildtyp-Stamm BUB8 und die BUB8*cla4* Mutante über den gleichen genetischen Hintergrund verfügen, ergaben die zwei Kreuzungen mit dem FB1 Stamm, der das Cla4-GFP Fusionsprotein exprimiert, unterschiedlich lange Luftmyzelien. Dies könnte auf das verlangsamte Wachstum und/oder auf eine reduzierte Fusionsfähigkeit der *cla4* Mutante zurückzuführen sein. Das GFP-Signal konnte in beiden Kreuzungen an der Spitze des wachsenden Dikaryons beobachtet werden. Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass das Cla4 Protein sowohl in haploiden, als auch in dikaryotischen Zellen am polarisierten Wachstum beteiligt ist. Außerdem könnte das Protein bei der Bildung der Halsregion am Übergang von der Mutter- zur Tochterzelle und bei der Bildung des primären Septums eine Funktion haben.

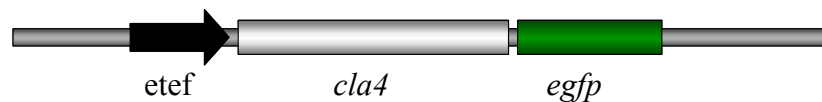


Abbildung 55: Konstrukt für das Cla4-GFP Fusionsprotein. Das *U. maydis cla4* Gen wurde hinter den konstitutiv aktiven etef-Promotor gesetzt und C-terminal mit *egfp* fusioniert.

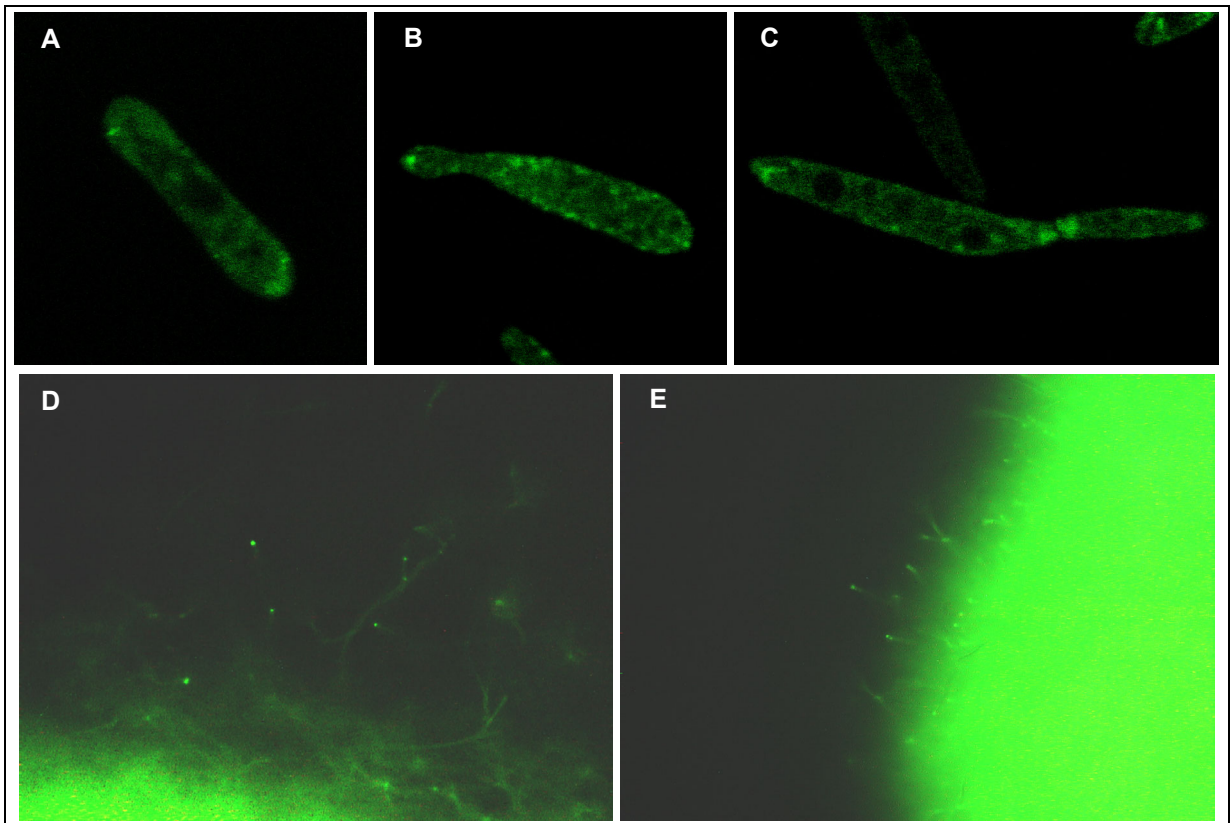


Abbildung 56: Lokalisierung des Cla4 Proteines in haploiden und in dikaryotischen Zellen.
 (A-C) Lokalisierung des Cla4-GFP Proteins in haploiden Wildtyp-Zellen (FB1).
 (D) Dikaryotisches Luftmyzel auf Charcoal Platte aus der Kreuzung BUB8 x FB1Umcla4GFP.
 (E) Dikaryotisches Luftmyzel auf Charcoal Platte aus der Kreuzung *cla4* x FB1Umcla4GFP. Der Unterschied in der Länge des Luftmyzel bei (D) und (E) lässt sich wahrscheinlich auf das verlangsamte Wachstum der *cla4* Mutante zurückzuführen.

19.3. Die Delokalisierung von Cla4 in $\Delta cdc10$ -Mutanten weist auf eine mögliche Interaktion mit dem Septin Cdc10 hin

Wie bereits beschrieben, konnte die Lokalisierung des Septins Cdc10 in *cla4* Zellen nicht bestimmt werden, da es trotz mehrfacher Versuche nicht gelang, das entsprechende Vektorkonstrukt in die *cla4*-Mutante zu transformieren. Um mehr über eine mögliche Interaktion zwischen den Cdc10 und Cla4 Proteinen zu erfahren, wurde die Lokalisierung des Cla4 Proteins in FB1 $\Delta cdc10$ Zellen untersucht. In unserer Arbeitsgruppe lag mit dem Stamm FB1 $\Delta cdc10$ bereits eine Septin-Mutante vor (M. Piscator und M. Bölker, unveröffentlicht). Die $\Delta cdc10$ -Zellen zeigen einen abnormalen Phänotyp, sie sind aufgeschwollen und zitronenförmig. Färbung mit WGA zeigte in den abgerundeten Zellen eine gleichmäßige Verteilung von Chitin über die gesamte Zellwand ähnlich wie in *cla4* Mutanten. Trotzdem

sind aber deutlich abgegrenzte Septen zu erkennen. (**Abbildung 57, A**). $\Delta cdc10$ -Zellen weisen zudem einen Defekt in der Verteilung der Kerne auf, die eher normal aussehenden Zitronenförmige Zellen enthalten zumeist jeweils einen Kern, während die größeren Strukturen aus abgerundeten Zellen entweder über keinen oder mehreren Nuklei verfügen (**Abbildung 57, B**).

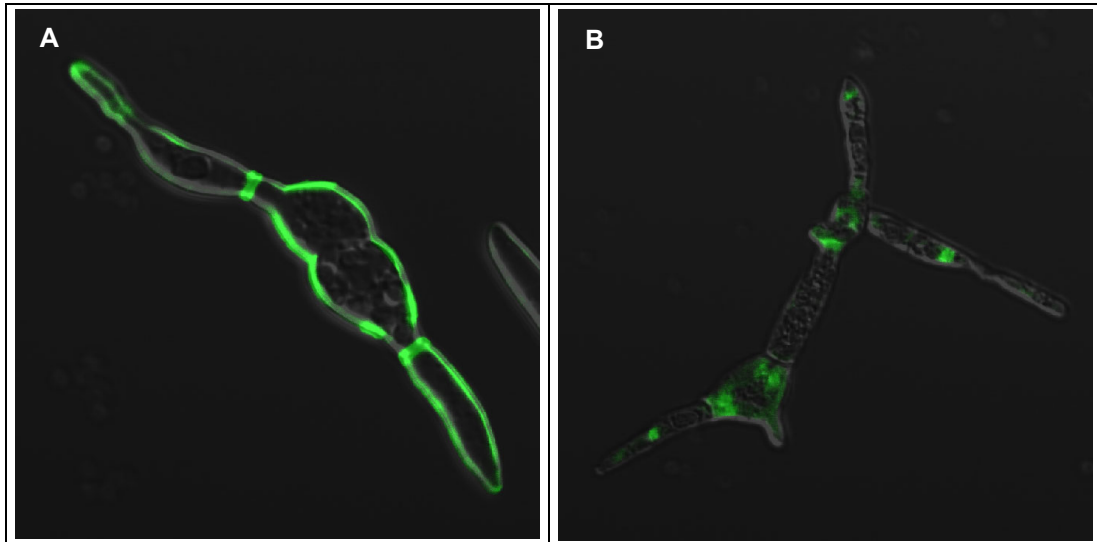


Abbildung 57: Phänotyp der FB1 $\Delta cdc10$ Mutante. (A) Chitinfärbung mit WGA. Die abgerundete abnormale Morphologie zeigenden Zellen lagerten über ihre gesamte Zellwand Chitin ein. Die Zellen zeigten außerdem Störungen in der Polarität. (B) Kernfärbung mit SYTO: Einige angeschwollene Zellen akkumulieren mehrere Zellkerne dafür enthalten andere Zellen keinen Zellkern.

Zur Lokalisierung von Cla4 wurde das Plasmid p123cla4GFP in FB1 $\Delta cdc10$ transformiert. In Wildtyp-Zellen wird das Cla4-Protein an Stellen aktiven Wachstums gefunden, so vorwiegend an den Stellen der zukünftigen Knospenbildung und in der Knospe an der Spitze (**Abbildung 56** und **Abbildung 58**). Die Expression von Cla4-GFP bewirkte in FB1 $\Delta cdc10$ Zellen eine ausgesprochen abgerundete Morphologie der Zellen, die voneinander nicht getrennt werden konnten und zum Teil verzweigte, Perlenketten-ähnliche Strukturen bildeten (**Abbildung 58**). Das Cla4-GFP Protein ist gleichmäßig im Cytoplasma verteilt (**Abbildung 58**), das Protein war aber nicht an den Spitzen der Zellen zu beobachten, wo die Knospenbildung erfolgte.

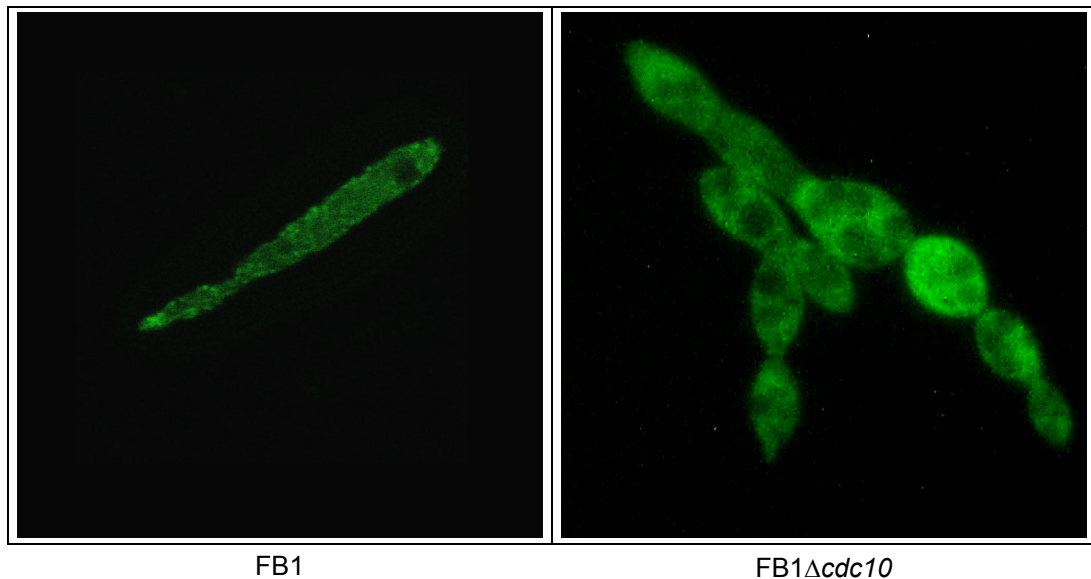


Abbildung 58: Lokalisierung des Cla4-GFP Proteins in der FB1 Δ cdc10 Mutante. In knospenden Wildtyp-Zellen (FB1) wurde das Cla4-GFP Protein an der wachsenden Knospenspitze gefunden. In der FB1 Δ cdc10 Mutante war das GFP Signal diffus in der ganzen Zelle oder unter der Zellwand in den abgerundeten Zellen zu sehen, wo diese aktiv gewachsen sind, aber es war nicht an den wachsenden Spitzen zu finden.

19.4. Cla4 reguliert die Polarität des Aktin-Cytoskeletts

In *S. cerevisiae* haben Untersuchungen gezeigt, dass Cdc42p und Cla4p an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt sind: Cdc42p lokalisiert an der Plasmamembran an den Stellen des aktiven Wachstums, und aktiviert über Cla4p eine Signalkaskade, die das Aktin-Cytoskelett organisiert (Ziman *et al.*, 1993). Die Aktivierung von Cdc42p erfolgt durch den Guaninnukleotid-Austauschfaktor Cdc24p. *cdc24* Mutanten zeigen eine delokalisierte Aktin-Verteilung und ein depolarisiertes Wachstum (Zheng *et al.*, 1994).

Um zu untersuchen, ob Cdc42 in *U. maydis* neben der Steuerung der Cytokinese über die Don1/Don3-Kaskade auch die Polarisierung des Aktin-Cytoskeletts reguliert und ob dabei Cla4 beteiligt ist, wurde der Einfluss dieser Genprodukte auf die Aktinlokalisierung in *U. maydis* bestimmt.

19.4.1. Aktin-Lokalisierung in Wildtyp-Zellen

Die Lokalisierung des Aktin-Cytoskeletts wurde zuerst in *U. maydis* Wildtyp-Zellen untersucht. Immunfärbung des Aktin-Cytoskeletts zeigt eine polarisierte Lokalisierung von Aktin an der Stelle der zukünftigen Knospenbildung in haploiden Zellen und an der wachsenden Spitze der Knospe (**Abbildung 59**). Nach der Abschnürung der Tochterzelle

wird Aktin an dem entgegengesetzten Pol akkumuliert, wo die nächste Knospe gebildet wird. Untersuchungen der Lokalisierung von Aktin-GFP Fusionsproteins von anderen Gruppen zeigten, dass außer Aktin-„patches“ in *Ustilago* auch langgezogene Aktin-Bündel gefunden werden können, die während der Zellteilung in der Halsregion lokalisiert sind (F. Banuett, persönl. Mitteilung).

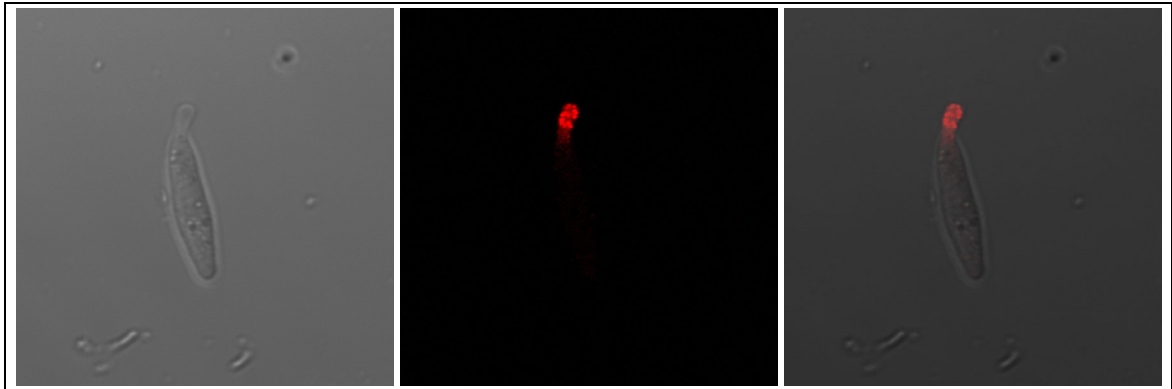


Abbildung 59: Aktin-Lokalisierung in BUB8 Wildtyp-Zellen. Immunostaining des Aktin-Cytoskeletts in Wildtyp-Zellen zeigt, dass Aktin an der wachsenden Spitze der Knospe, akkumuliert ist. Nach der Abschnürung der Tochterzelle wird Aktin an dem entgegengesetzten Pol akkumuliert, wo die nächste Knospe gebildet wird.

19.4.2. In *don1* Zellen wird eine normale Aktinverteilung beobachtet

don1 Zellen zeigen dem Wildtyp ähnliche polarisierte Akkumulation des Aktin-Cytoskeletts am wachsenden Ende der Knospe und im Bereich der Halsregion zwischen Mutter- und Tochterzelle. Obwohl die Zellen dieser Mutante nicht abgetrennt werden, akkumulieren die Tochterzellen an dem neuen Pol Aktin (**Abbildung 60**). Da die Zellen zusammenbleiben, bleibt die Aktin-Akkumulation auch inmitten der bäumchenartigen Strukturen am Septum an der Tochterseite zu erhalten. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Polarisierung des Aktin-Cytoskeletts in der *don1* Mutante nicht betroffen ist, die Akkumulation erfolgt den Wildtyp-Umständen entsprechend, auch wenn die abwechselnde Knospenbildung und die Zelltrennung blockiert sind.

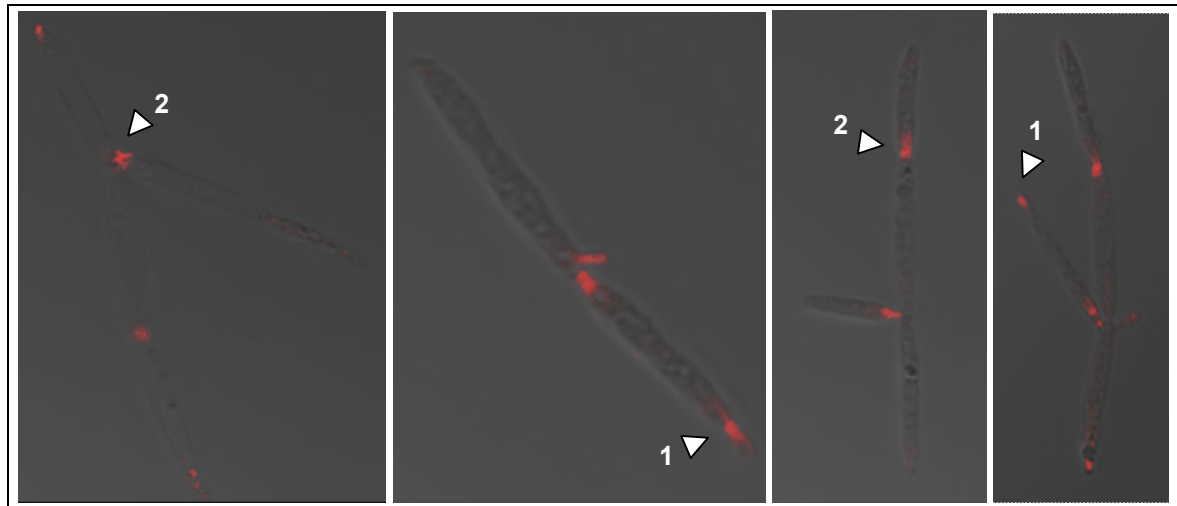


Abbildung 60: Aktin-Lokalisierung in *don1* Zellen. *don1* Zellen akkumulieren Aktin dem Wildtyp ähnlich an den wachsenden Spitzen der neuen Knospen (1). Da die Tochterzellen von der Mutter nicht abgetrennt werden, ist die Aktin-Akkumulation auch inmitten den Strukturen an dem Septum an der Tochterseite zu sehen, wo die Zelle normalerweise ihre nächste Tochterzelle bilden würde (2). Die abwechselnde Polarisierung des Aktin-Cytoskeletts ist in dieser Mutante normal.

19.4.3. In *cla4* Mutanten ist die Aktinverteilung gestört

In Einzelzellen der *cla4* Mutante wurde Aktin an beiden Polen gefunden (**Abbildung 61, A, B**). Obwohl manche Zellen in der Mitte ein einfaches Septum bildeten, akkumulierte kein Aktin an dieser Stelle, sondern weiterhin an den Polen, wo sie vermutlich weiterwachsen (**Abbildung 61, C**). Auch in den aus mehreren Zellen bestehenden Strukturen erfolgte keine polarisierte Umlagerung des Aktin-Cytoskeletts, sondern das Aktin war immer nur an den äußeren, wachsenden Polen zu sehen. Diese Daten deuten auf eine Störung des Polaritätswechsels in den *cla4*-Mutanten hin (**Abbildung 61, D**).

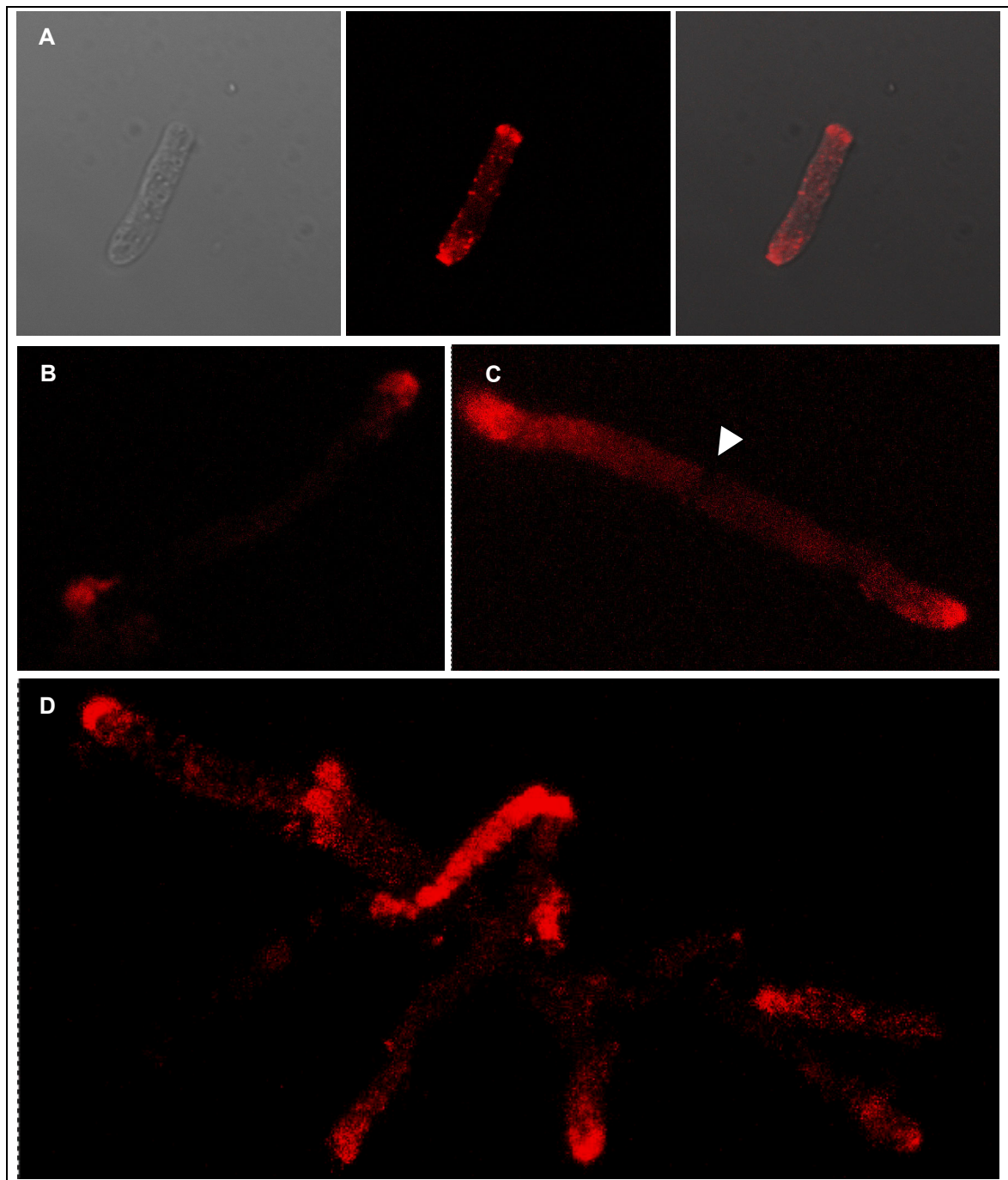


Abbildung 61: Aktin-Lokalisierung in *cla4* Zellen. (A, B) In *cla4* Zellen wurden Aktin-„patches“ in abgebrochenen Einzelzellen an beiden Polen gefunden, was darauf hinweist, dass die Zellen an ihren beiden Enden wachsen. (C) Die größer gewordene Zelle bildete in ihrer Mitte ein unregelmäßiges Septum, wuchs jedoch weiterhin an ihren beiden Polen und akkumulierte kein Aktin an diesem Septum. (D) In größeren Strukturen wurden Aktin-Akkumulationen weiterhin immer an den wachsenden Enden, aber nicht am Septum gefunden.

19.5. *cla4* Zellen zeigen bei erhöhter Temperatur einen Defekt in der Kernverteilung

Bei der Untersuchung, ob die neuen *don*-ähnlichen Mutanten Temperatursensitivität zeigen, wurde beobachtet, dass in *cla4*-Zellen bei erhöhter Temperatur eine Störung der Kernverteilung auftritt: In einigen Zellen befanden sich mehrere Zellkerne, während in anderen kein Zellkern gefunden wurde (**Abbildung 62**). Dies zeigte, dass die *cla4*-Mutante die Kernteilung noch vollziehen kann, die Verteilung der Kerne aber nicht in allen Fällen korrekt erfolgt, was auch eine Verzögerung in der Zellteilung verursacht.

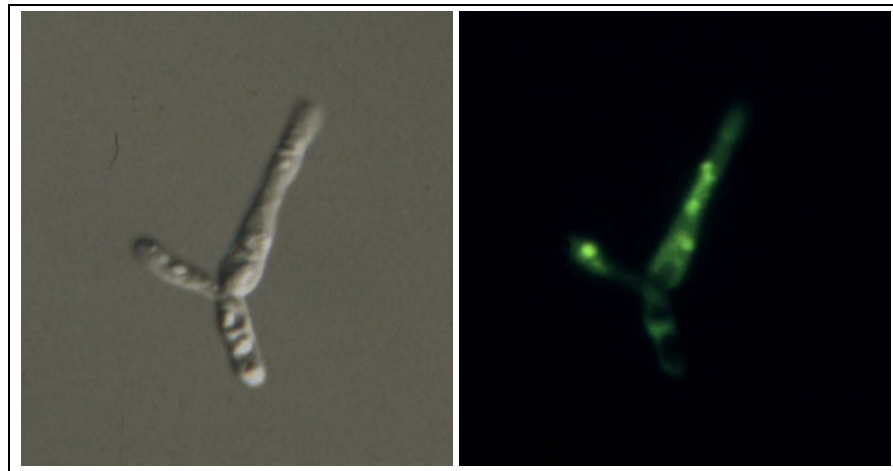


Abbildung 62: Mitose-Defekt in der *cla4* Mutante bei der restriktiven Temperatur. In den Zellen der *cla4* Mutante konnten bei 34°C in manchen Zellen zwei oder mehrere Zellkerne, und in anderen Zellen keinen Zellkern beobachtet werden, was auf eine Störung der Kernverteilung hinweist.

19.6. Cla4 ist Teil eines weiteren Cdc42 abhängigen Signalweges in *U.maydis*

Anhand der bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Mutation von Cla4, einer Ste20-ähnlichen Protein Kinase zu einem deutlichen morphologischen Phänotyp führt, der sehr stark dem von Zellen ähnelt, die eine dominant negative Variante von Cdc42 exprimieren. Während die Don1/Cdc42/Don3 Kaskade für die Bildung des sekundären Septums während der Cytokinese verantwortlich ist, spielt das Cla4 Protein zusammen mit Cdc42 eine Rolle beim polarisierten Wachstum und ist vermutlich auch an der Lokalisierung des Septin-Netzwerkes bei der Knospung beteiligt. Cla4 enthält eine klassische CRIB Domäne, die über die Bindung von GTP-Cdc42 die Aktivität der Kinase reguliert. Die regulierte Aktivität von Cla4 ist anscheinend für die korrekte Ausrichtung des Aktin-Cytoskeletts während der Zellteilung verantwortlich (**Abbildung 63**).

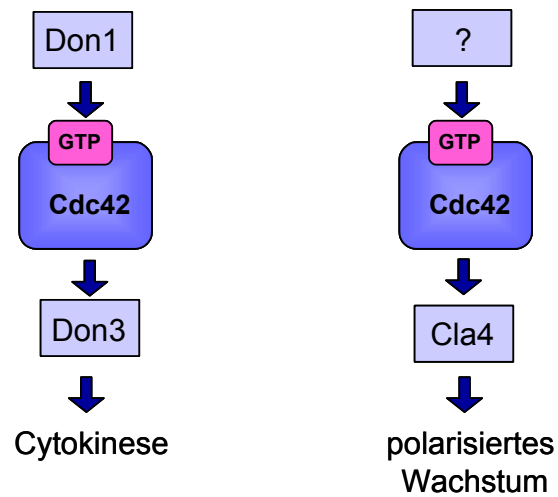


Abbildung 63: Cdc42 beteiligte Kaskaden in *U. maydis*. Die Don1/Cdc42/Don3 Kaskade ist für die Bildung des sekundären Septums verantwortlich, während die Cdc42/Cla4 Kaskade für das polarisierte Wachstum benötigt wird.

VI. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Cytokinese-Mutanten durch UV-Mutagenese isoliert, die einen ähnlichen Teilungsdefekt aufweisen wie die bereits bekannten *don1* und *don3* Mutanten. Nach einer Komplementationsanalyse dieser Mutanten mit *don1* und *don3* Stämmen wurden 5 Mutanten weiter charakterisiert, die in unterschiedlichen Genen betroffen waren (*don4*, *don5*, *don6*, *dol1*, *cla4*). Mit Hilfe der Epistasis-Analyse mit dem konstitutiv aktiven Cdc42^{Q61L} Protein konnten die *don1*, *don3*, *don5* und *don6* Allele in die Don1/Cdc42/Don3-Kaskade eingeordnet werden. Untersuchungen mit dominanter Allelen von *cdc42* gaben Hinweise auf eine Rolle dieses Proteins bei der Zellpolarität. Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine der neu isolierten Mutanten (*cla4*) molekularbiologisch und zellbiologisch charakterisiert und ihre Rolle in einer weiteren, Don-unabhängigen Cdc42 Kaskade gezeigt, die für das polarisierte Wachstum verantwortlich ist.

20. Identifizierung neuer Cytokinese-Mutanten

Bei einer Suche nach weiteren Elementen der Don1/Cdc42/Don3 Signalkaskade wurden 57 Cytokinese-Mutanten isoliert, die einen *don1* und *don3* Mutanten ähnlichen bäumchenartigen Phänotyp zeigten und die Zelltrennung nicht vollziehen konnten. Die Komplementations-Analyse dieser Mutanten mit *don1* und *don3* wies auf eine ungewöhnlich große Häufigkeit von Mutationen im *don1* Gen hin: 41 der 52 untersuchten Mutanten (78,8%) waren in diesem Gen mutiert. Dies könnte auf eine erhöhte Mutationsrate in *don1* hinweisen, die durch ein „mutational hotspot“ verursacht sein könnte. Sequenzanalysen der neu isolierten Allele von *don1* könnten eine Antwort darauf geben, ob diese große Anzahl der unabhängigen Mutationen in *don1* auf die Größe des Genes (3996 bp) und/oder auf einen Hotspot zurückgeführt werden kann. Interessanterweise wurde in dem ähnlich großen *don3* Gen (2517 bp) kein neues Allel gefunden.

21. Zellbiologische Charakterisierung der neu isolierten Cytokinese-Mutanten

Von den 5 Mutanten, die weitercharakterisiert wurden, zeigten die *don4*, *don5* und *don6* Mutanten einen deutlichen *don*-artigen Phänotyp. Die *don4* und *don5* Mutanten in zellbiologischen Untersuchungen zeigten, dass sie in einigen Fällen zur Akkumulation von Membranstrukturen am primären Septum und zur Bildung eines sekundären Septums fähig waren und die Zelltrennung teilweise ablaufen konnte. Dies weist darauf hin, dass die *don4*

und *don5* Mutanten in einem frühen Schritt beteiligt sind, wie z.B. der Vesikelakkumulation, diese aber in den Mutanten nicht vollständig blockiert, sondern eventuell durch Diffusion verlangsamt stattfinden kann. Die *don6* Mutante bildete nur ein primäres Septum und war überhaupt nicht fähig an der Tochterseite des primären Septums Membranstrukturen zu akkumulieren, was darauf hinweist, dass das Don6 Protein ebenfalls vor der Bildung des sekundären Septums benötigt wird (**Abbildung 64**).

Die *dol1* und *cla4* Mutanten bilden zwar auch nur ein Septum, aufgrund ihrer deutlich abweichenden Zellmorphologie können sie jedoch nur schwer in die normale Cytokinese-Kaskade eingeordnet werden. Die zellbiologische Charakterisierung der *dol1* Mutante wies auf ein unregelmäßiges Septum hin. Die sternchenförmigen Strukturen und Ketten zeigen einen zusätzlichen Polaritätsdefekt auf. In den Ketten der *cla4* Mutante konnten mit Chitin-Färbungen unregelmäßige Septen nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass sie ihre Knospen in allen Richtungen bildeten, weist ebenfalls auf eine Störung in der Polarität in diesen Zellen hin. Akkumulation von Membranstrukturen an der Tochterseite des Septums können in den *dol1* und *cla4* Mutanten nicht beobachtet werden (**Abbildung 64**).

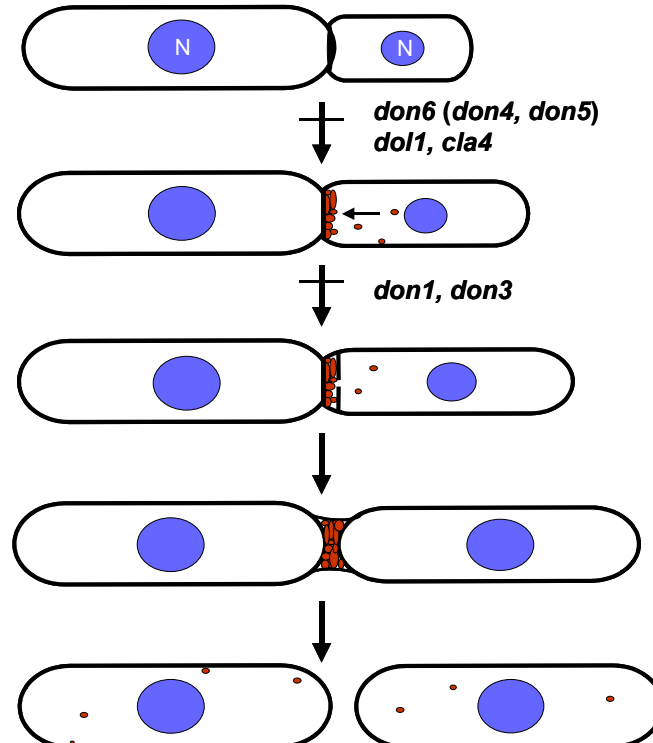


Abbildung 64: Cytokinese Mutanten sind gestört in verschiedenen Stadien der Septumbildung und Zelltrennung. Die neu isolierten Cytokinese Mutanten können aufgrund ihrer Morphologien in die Septierungskaskade eingeordnet werden.

Es konnten keine Mutanten mit ausgesprochener *don*-Morphologie isoliert werden, die regelmäßigen bäumchenartigen Phänotyp aufwiesen und die Zelltrennung nicht vollziehen konnten, was darauf hinweist, dass möglicherweise keine weitere Proteine direkt an der Bildung des sekundären Septums beteiligt sind, oder dass solche Gene eventuell essentiell sein können. In diesem Screen wurden keine Mutanten isoliert, die gar kein Septum mehr bilden konnten. In der Hefe wiesen solche Zellteilungsmutanten, die kein Septum bilden können, einen mehrkernigen Phänotyp auf. In dieser Arbeit wurde jedoch auf solche Mutanten mit einem mehrkernigen Phänotyp nicht selektioniert, und es wäre vorstellbar, dass Mutanten, die in der Bildung des primären Septums gestört sind, einen ähnlichen Phänotyp hätten.

Interessanterweise ist in den *don4* und *don5* Mutanten die Lokalisierung der Don1 FYVE Zn-Finger Domäne gestört. Normalerweise wird die Don1 FYVE Zn-Finger Domäne in Wildtyp-Zellen an Endosomen- und Vakuolen-Membranen gefunden. Dies kommt daher, dass für die FYVE Domäne gezeigt werden konnte, dass sie spezifisch Phosphatidylinositol-3-monophosphat (PI(3)P) bindet. Dieses Phospholipid ist charakteristisch für Membranen der Endosomen und Vakuolen. Während der Septumbildung akkumulierten diese Endosomen in der Fragmentierungszone. PI(3)P ist nötig für den Vesikel-vermittelten Transport neu synthetisierter vakuolärer Enzymen von trans-Golgi-Netzwerk zu den Vakuolen (De Matteis *et al.*, 2002). Da die Akkumulation vermutlich enzymhaltiger Vesikel bei der Septierung in *U. maydis* anscheinend eine wichtige und bis jetzt unbekannte Rolle spielt, wäre es interessant zu untersuchen, ob der PI(3)P-Kinase Inhibitor Wortmannin (Jones and Howell, 1997) auch in *U. maydis* die Verteilung dieser Vesikel stört. Dies müsste sich auf die Lokalisierung der Don1 FYVE Zn-Finger Domäne auswirken. Wenn diese kein Target an Endosomen- und Vakuolen-Membranen zur Verfügung hätte, könnte eventuell auch keine Fragmentierungszone gebildet werden und die Zelltrennung gestört sein.

Phosphatidylinositole werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und im ER, im Zellkern, im Golgikomplex, an Endosomen oder an der Plasmamembran von spezifischen Kinasen phosphoryliert. Ob die so entstandenen Phosphatidylinositol Pools miteinander in Kommunikation und im Gleichgewicht stehen, ist jedoch noch unsicher (De Matteis *et al.*, 2002). PI(3)P Kinasen phosphorylieren Phosphatidylinositole (PI), wodurch PI(3)P entsteht, das das spezifische Target von FYVE Zn-Finger Domäne erhaltenden Proteinen ist. Da PI(3)P in den Membranen des Golgi Komplexes, von früher Endosomen und der Vakuolen sowohl in

Hefe- als auch in Säugerzellen angereichert ist (**Abbildung 65**), wird der Don1 FYVE Zn-Finger – GFP Signal an diesen Membranen beobachtet.

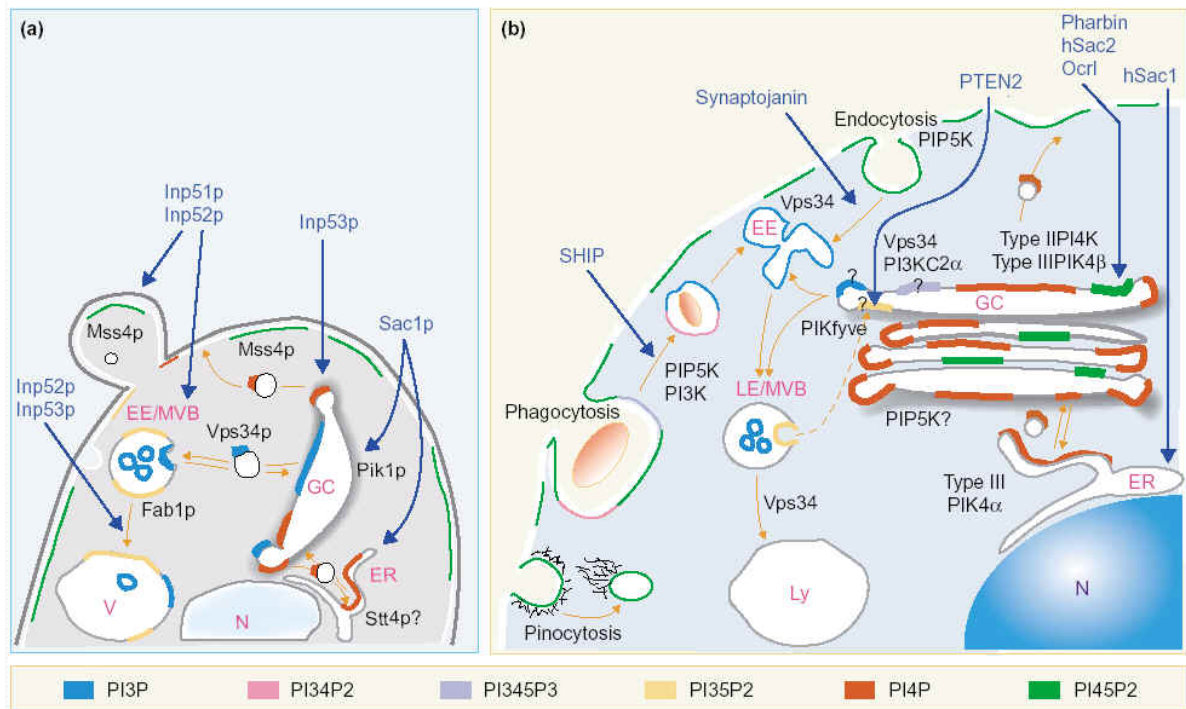


Abbildung 65: Subzelluläre Verteilung der Phosphatidylinositole (De Matteis *et al.*, 2002). (a) Hefe- und (b) Säugerzellen. EE, früh Endosom; LE, spät Endosom; Ly, Lysosom; MVB, multivesicular body; N, Nukleus; V, Vakuolum. Die verschiedenen Phosphatidylinositole sind mit verschiedenen Farben markiert. Die Kinasen und Phosphatasen in den unterschiedlichen Kaskaden sind angezeigt. PI45P2 lokalisiert hauptsächlich in der Plasmamembran, 3-phosphorilierte Phosphatidylinositole an dem endosomalen System und PI4P in dem Golgi Komplex.

Da in den *don4* und *don5* Zellen eine Mislokalisierung der Don1 FYVE Zn-Finger Domäne beobachtet wird, könnte dies auf eine Funktion von *don4* und *don5* bei der korrekten Bildung oder Verteilung von PI(3)P hindeuten. Da PI(3)P essentiell für die Vesikel-Sortierung ist, könnte der Mangel nur eine zufällige Lokalisierung von Endosomen ans primäre Septum zulassen. Die Vervollständigung der Septumbildung und der Cytokinese könnte dann in einigen wenigen Zellen verzögert ablaufen. Diese Möglichkeit könnte durch die Identifizierung der betroffenen Genen (*don4*, *don5*) geklärt werden. Untersuchungen des Motorproteins Kin3 in *U. maydis* zeigten, dass dieses für die Mikrotubuli vermittelte Motilität der Endosomen verantwortlich ist. Interessanterweise zeigten *kin3⁻* Zellen ebenfalls einen Cytokinesedefekt und einen *don*-ähnlichen bäumchenartigen Phänotyp (Wedlich-Soldner *et al.*, 2002). Jedoch war in diesen Zellen in der Regel das sekundäre Septum vollständig

ausgebildet. Dies weist darauf hin, dass möglicherweise zu wenig Endosomen sich in der Fragmentierungszone befinden und die Ablösung der Tochterzelle deshalb gestört ist. Es wäre also auch interessant das mikrotubuläre Cytoskelett in den neu isolierten Cytokinese-Mutanten zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit gefundenen neuen Cytokinese Mutanten bei *U. maydis* könnten Hinweise auf den Ablauf der Cytokinese auch in anderen Organismen liefern, denn die grundlegenden Mechanismen der Cytokinese sind in eukaryontischen Organismen hochkonserviert (Chang and Nurse, 1996; Fishkind and Wang, 1995; Glotzer, 1997; Gould and Simanis, 1997; Staehelin and Hepler, 1996). Allerdings unterscheidet sich die Cytokinese in *U. maydis* bereits deutlich von der in *S. cerevisiae* und *S. pombe*.

In Hefezellen wird, wie auch in Tierzellen, die Teilungsebene durch einen Aktin- und Myosin-enhaltenden kontraktilen Ring eingeschnürt (Mabuchi and Okuno, 1997). In der Hefe startet die Bildung des Aktomyosin-Ringes am Anfang des Zellzyklus (späte G₁ Phase) mit der Markierung der Knospungsstelle durch die Typ II Myosine, Myo1p. In der späten Anaphase erscheint F-Aktin an der Teilungsebene und die beiden formen einen funktionellen Aktomyosin-Ring (Bi *et al.*, 1998; Lippincott and Li, 1998). Das zentripetale Wachstum des Septums folgt der Kontraktion des Aktomyosin-Ringes (Bi *et al.*, 1998). Das Septum besteht aus drei Schichten: In der Mitte befindet sich das primäre Septum, das aus Chitin besteht und durch die Chitin-Synthase II und III synthetisiert wird. Das primäre Septum wird von beiden Seiten von sekundären Septen umgeben, deren Zusammensetzung der der Zellwand ähnlich sind (Cabib *et al.*, 2001). Nachdem das Septum voll gebildet ist, löst die Chitinase das primäre Septum auf und die Mutter- und Tochterzellen werden voneinander getrennt (**Abbildung 66**) (Surana *et al.*, 2002). Ähnlich wie in *S. cerevisiae*, wird auch in *S. pombe* das primäre Septum nach der vollständigen Bildung der sekundären Septen zentripetal degradiert und die Zellen werden voneinander getrennt. Die F-Aktin Flecken werden zu den alten Enden der Zelle umlokalisiert, wo sie weiterwachsen (**Abbildung 66**) (Johnson *et al.*, 1973).

Dagegen wird in *U. maydis* ein abgetrenntes sekundäres Septum an der Tochterseite des primären Septums gebildet (**Abbildung 66**). Für diesen Schritt sind die Don1 und Don3 Proteine verantwortlich, für die es auch in Hefe keine direkte Homologe gibt. Interessanterweise existieren jedoch in Säugetieren verwandte Proteine, die auf eine hochkonservierte Funktion hinweisen.

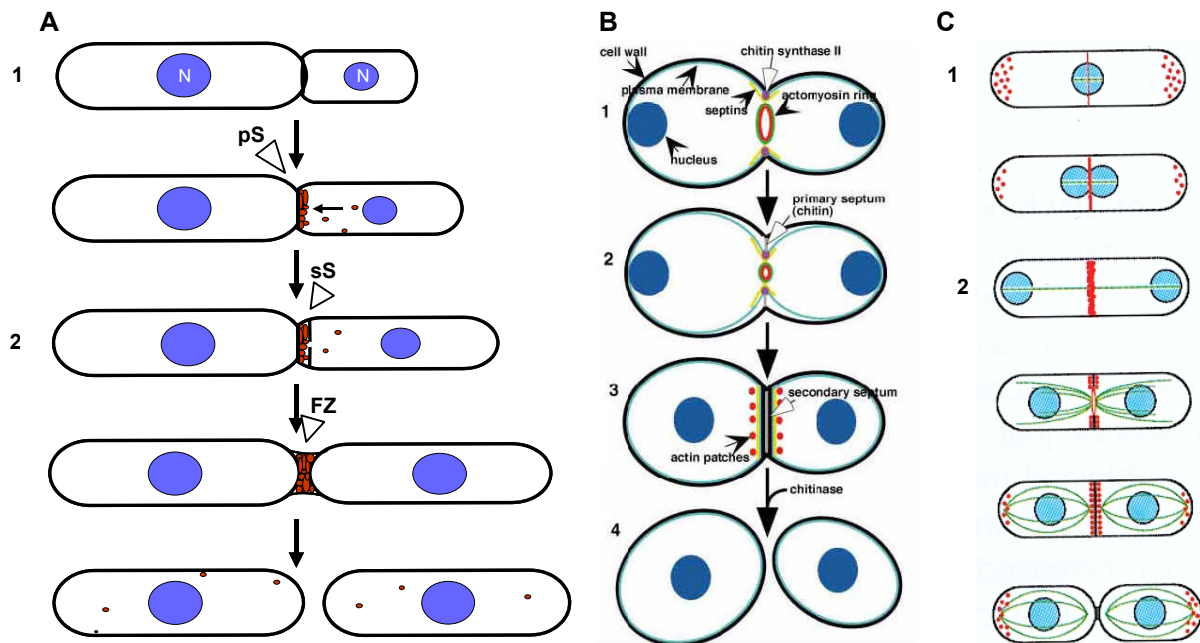


Abbildung 66: Septumbildung und Cytokinese in hefeartigen Pilzen. (A) *U. maydis* (N) Nukleus (rot) Endosomen. (1) Nach der Bildung des primären Septums werden Endosomen am Septum akkumuliert und bilden dort die Fragmentierungszone. (pS) primäres Septum (2) Bildung des sekundären Septums an der Tochterseite des primären Septums. Nach der Septumbildung wird die Fragmentierungszone wahrscheinlich aufgelöst, was zur Zelltrennung führt. (sS) sekundäres Septum (FZ) Fragmentierungszone **(B) *S. cerevisiae*** (Bi, 2001). (blau) Nukleus (rot-grün) Aktomyosin-Ring (gelb) Septine (lila) Chitin Synthase. (1-2) Septine markieren die Stelle der Septumbildung und werden für die Bildung des Aktomyosin-Ringes benötigt. Nach der Kontraktion dieses Ringes beginnt das zentripetale Wachstum des primären Septums. (3) Bildung des sekundären Septums und Umpolarisierung des Aktin-Cytoskeletts. (4) Chitinase löst das primäre Septum, die Zelltrennung erfolgt. **(C) *S. pombe*** (Simanis, 2002). (blau) Nukleus (rot) Aktin Flecken und Bündel (grün) Mikrotubuli (1) Markierung der Stelle der Septumbildung an der Teilungsebene. Der mediale Ring wird positioniert und gebildet. Der Kernteilung erfolgt. (2) Polarisierung der Aktin Flecken, die Bildung des Septums fängt an. Der mediale Ring wird kontrahiert und die Synthese des sekundären Septums beginnt. Letztendlich wird das primäre Septum abgebaut und die Zelltrennung erfolgt.

22. Epistasis-Analyse der *don1*, *don3*, *don5*, *don6* und *cla4* Mutanten zeigt ihre Stelle in der Cdc42 Signalisierungskaskade

Bei der Bildung des sekundären Septums in *U. maydis* spielt die Don1/Cdc42/Don3 Signalkaskade eine entscheidende Rolle. Die Sequenz-Analyse von Don1 wies darauf hin, dass dieses Protein als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) eine kleine GTPase der Rho/Rac Familie spezifisch aktiviert. Das Don3 Protein kodiert eine konservierte Kinase der Familie von Ste20-ähnlichen Kinasen, die als Target für kleine GTPasen der Rho/Rac Familie identifiziert wurden. Yeast-Two-Hybrid Untersuchungen zeigten eine Interaktion der Don1 und Don3 Proteinen nur mit einem Mitglied der Rho/Rac Familie, Cdc42, aber nicht mit

Rac1, Rho2 oder Rho3, was auf eine mögliche Funktion von Cdc42 in der Don1/Don3 Signalkaskade hinweist. Die direkte Interaktion zwischen Cdc42 und Don3 war zudem unerwartet, weil Don3 keine klassische Cdc42-Bindungsdomäne (CRIB) besitzt. Auf welche Aktivierung von Don3 durch Cdc42 erfolgt, ist noch vollkommen unbekannt (Weinzierl *et al.*, 2002).

Die Rolle von Cdc42 in diesem Signalweg war nur durch die Ergebnisse der Yeast-Two-Hybrid Versuche vermutet worden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression einer konstitutiv aktiven Variante von Cdc42 in der Lage ist, den Phänotyp von *don1* Mutanten zu retten. Interessanterweise erfolgte die korrekte Bildung des sekundären Septums und die Ablösung der Zellen nicht nur in neugebildeten Knospen, sondern auch in älteren Zellen. Dies deutet darauf hin, dass in *don1* Zellen der Ort für das sekundäre Septum bereits festgelegt ist und auch nach längerer Zeit noch für die Septenbildung benutzt werden kann. In *don3* Zellen erfolgt keine Wiederherstellung der Zelltrennung. Dieses Ergebnis bestätigt die vermutete Funktion von Cdc42 „unterhalb“ von Don1 und „oberhalb“ der Kinase Don3, die vermutlich einen Effektor von Cdc42 darstellt.

Mit diesem Ergebnis war es auch möglich, die weiteren, in dieser Arbeit isolierten *don*-ähnlichen Mutanten mit Hilfe einer Epistasis-Analyse durch die Expression des konstitutiv aktiven Cdc42, bezüglich des Don1/Cdc42/Don3 Signalwegs einzuordnen. Die Expression von Cdc42^{Q61L} in den *cla4* und *don5* Mutanten stellte die Wildtypmorphologie nicht wieder her. Die *cla4* Mutante zeigte weiterhin ihren charakteristischen Phänotyp. Auch die bäumchenartigen Strukturen in der *don5* Mutante blieben erhalten. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Cla4 und Don5 Proteine in der Cdc42 Kaskade entweder „unterhalb“ von Cdc42 wirken oder eine Rolle in einem unabhängigen Signalweg spielen. Dagegen zeigte die *don6* Mutante nach der Expression von Cdc42^{Q61L} wieder normale, Wildtyp-ähnliche Morphologie, die bäumchenartigen Strukturen wurden aufgelöst und nach ÜN Induktion wurden neben kleineren Bäumchen viele abgetrennte Einzelzellen beobachtet. Dies weist darauf hin, dass das Don6 Protein ebenso wie Don1 „oberhalb“ von Cdc42 in der Kaskade einzuordnen ist. Es war aber auch nicht auszuschließen, dass in der *don6* Mutante das *cdc42* Gen direkt betroffen sein könnte. Um dies zu überprüfen, wurden Sequenzanalysen des *cdc42* Allels in der *don6* Mutante durchgeführt.

Die Sequenzanalyse zeigte, dass eine stille Mutation in dem *cdc42* Gen der *don6* Mutante entstanden ist: Das Cytosin am Basenpaar 72 (ACC), wurde durch Thymin ersetzt (ACT), was zu keinem Austausch in der Aminosäuresequenz führt: An der Aminosäureposition 24 befindet sich weiterhin ein Threonin (T). Da der genetische Hintergrund des parallel sequenzierten Wildtyp-Stammes (BUB8) mit dem der *don6* Mutante übereinstimmte, konnte es ausgeschlossen werden, dass der Basenunterschied auf einen Polymorphismus zurückzuführen ist. Um zu überprüfen, ob die stille Mutation im *cdc42* Gen die Funktion von Cdc42 in der *don6* Mutante beeinträchtigt, wurde untersucht, ob der Phänotyp von *don6* auch durch die Expression des Wildtyp Cdc42 Proteins komplementiert werden kann. Die Beobachtungen zeigten, dass in den Cdc42-exprimierenden *don6* Zellen die Zelltrennung wieder korrekt funktionierte. Dies weist darauf hin, dass der Basenaustausch sich auf die Funktion von Cdc42 auswirken könnte.

Es ist zwar schwer vorzustellen, wie eine stille Mutation die Funktion eines Proteins beeinflussen könnte, jedoch zeigten neuere Untersuchungen, dass alle Arten von Punktmutationen, einschließlich von missense und stiller Mutationen, zu einer Veränderung im pre-mRNA Splicing führen können (Liu *et al.*, 2001; Maquat, 2001). „Exonic splicing enhancer“ (ESE) und „silencer“ (ESS) Elemente sind weit verbreitet, 15-20% zufällig gewählter 18-20 bp lange Sequenzen können das RNA-Splicing beeinflussen (Blencowe, 2000). Dies geschieht vorwiegend über die Veränderung von ESEs und führt teils oder ganz zum Exon Skipping (Cartegni *et al.*, 2002). ESEs sind 6-8 Nukleotid lange Sequenzen, die für das Splicing der Exons nötig sind, in dem sie liegen und die von Splicing Faktoren erkannt werden (**Abbildung 67**) (Liu *et al.*, 2001).

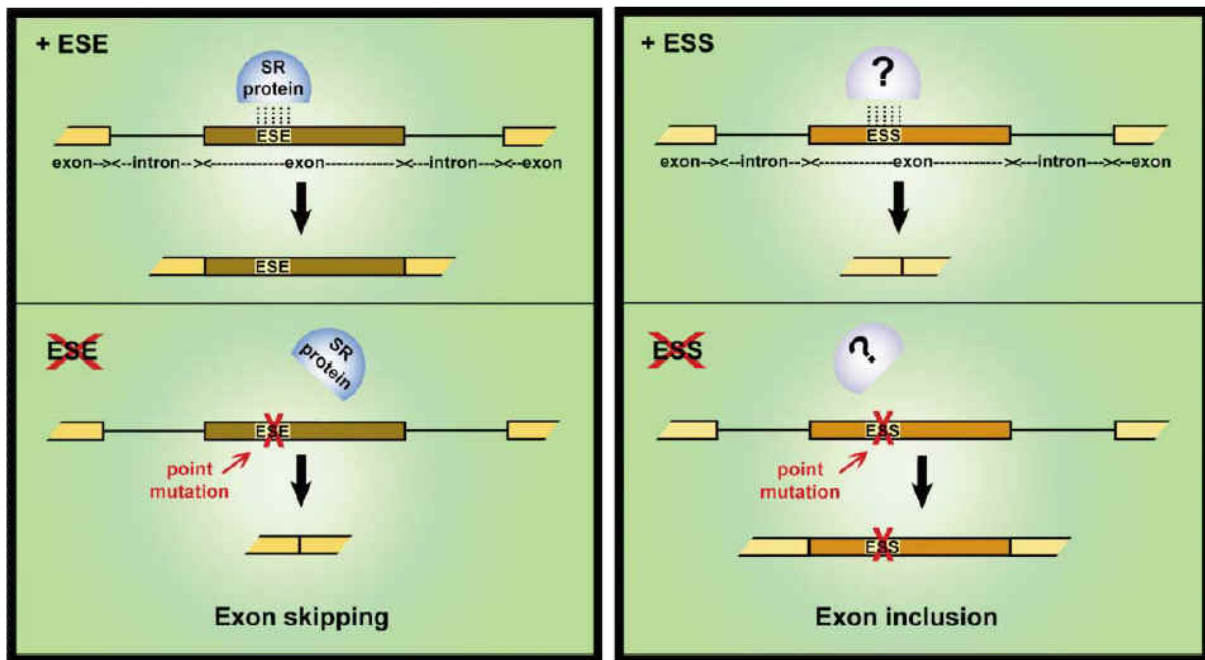


Abbildung 67: Einfluss von Mutationen auf das RNA Splicing (Maquat, 2001). Nonsense, missense oder stille Mutationen, die in den ESE (exonic splicing enhancer, links) oder in den ESS (exonic splicing silencer, rechts) Bereich fallen, können Exon Skipping oder Exon Einführung verursachen. ESEs steigern normalerweise die Verwendung der schwachen Splice-Stellen und fördern die Einführung der Exon. Eine Punktmutation kann die ESE Sequenz zerstören und zur Exon Skipping führen. ESSs hemmen die Verwendung der Splice-Stellen und verursachen Exon Skipping oder hemmen das Splicing der terminalen Exon. Eine Mutation in dieser Sequenz verursacht Exon Einführung. (SR, Serin/Arginin-reiche Protein, Splicing Faktor)

Ob es im Falle der *don6* Mutante zu einer solchen Beeinflussung der mRNA Bildung von *cdc42* kommt, könnte nur durch weitere Experimente beantwortet werden. Die C72T Punktmutation müsste in das Wildtyp *cdc42* Gen eingeführt werden und wenn dieser Austausch zu dem ursprünglich beobachteten Phänotyp führt, wäre es sichergestellt, dass *don6* und *cdc42* allelisch sind. Es wäre aber auch möglich, dass der Phänotyp der *don6* Mutante nur aufgrund der Überproduktion von Cdc42 wiederhergestellt würde und die eigentliche Mutation in einem Effektor von Cdc42 liegt.

Aufgrund der Ergebnisse der Epistasis-Analyse und des Komplementationsversuchs lassen sich die neu isolierten Cytokinese Mutanten oberhalb und unterhalb von Cdc42 in die Don1/Don3 Kaskade einordnen. Die Komplementation der *don6* Mutante durch das Wildtyp-Allel von *cdc42* lässt vermuten, dass *don6* mit *cdc42* allelisch sein könnte. Der Wildtyp-Phänotyp konnte in den *don5* und *cla4* Mutanten durch die Expression von Cdc42^{Q61L} nicht hergestellt werden, was zeigt, dass die Don5 und Cla4 Proteine entweder unterhalb von Cdc42

aktiviert werden, oder sie gehören nicht zu dieser Cdc42 Signalisierungskaskade (**Abbildung 36**).

In *don1* und *don3* Zellen wurde bei der Färbung mit WGA eine stärkere Fluoreszenz über die gesamte Zellwand beobachtet als in Wildtyp-Zellen. Jedoch konnte durch die Expression von Cdc42^{Q61L} die normale Chitin-Ablagerung in der Zellwand in beiden Mutanten wiederhergestellt werden. Diese Beobachtung konnte auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. Da auch in *don3*-Zellen der gleiche Effekt beobachtet werden konnte, auch wenn diese Zellen im Gegenwart von Cdc42^{Q61L} kein sekundäres Septum bilden, muss die Zellwandablagerung über eine Don-unabhängige Kaskade von Cdc42 reguliert werden (**Abbildung 36**).

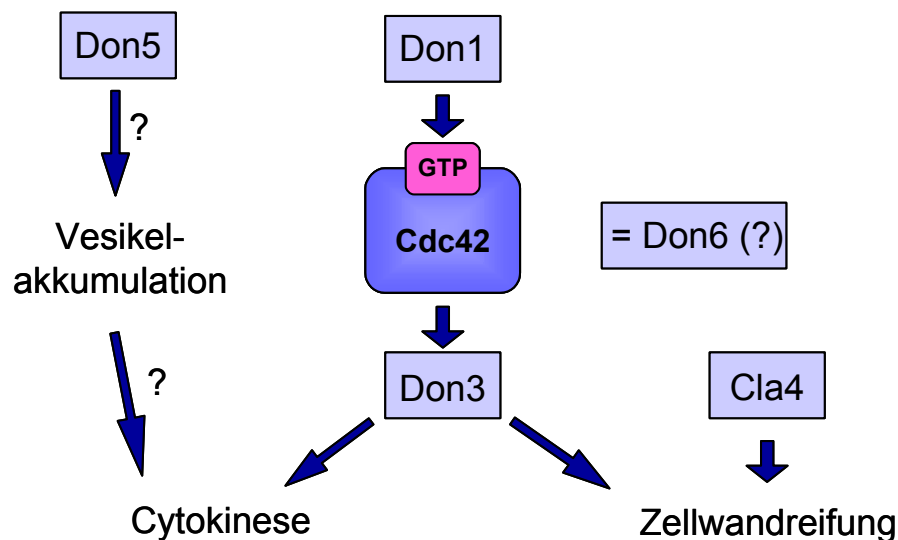


Abbildung 68: Hypothetische Anordnung der untersuchten Cytokinese Mutanten in die Cdc42 Signalkaskade. Epistasis-Analyse der *don5*, *don6* und *cla4* Mutanten mit Cdc42^{Q61L} lassen vermuten, dass Don6 mit Cdc42 allelisch sein könnte und Cla4 unterhalb von Cdc42 überschrieben wird oder in einer unabhängigen Kaskade eine Rolle spielt. Untersuchungen mit der Cdc42^{Q61L} Variante konnte die Rolle von Cdc42 in zwei Kaskaden der Septumbildung und Zellwandreifung gezeigt werden. Don5 könnte eine Rolle in der Akkumulation von Vesikel am primären Septum spielen, die für die Cytokinese notwendig ist.

Die normale Chitin-Ablagerung in den *don5*, *don6* und *cla4* Mutanten konnte durch die Expression von Cdc42^{Q61L} nicht wiederhergestellt werden, was dafür spricht, dass diese Mutanten auch für den korrekten Zellwandaufbau benötigt werden.

Diese Beobachtungen sprechen für eine Rolle der hier untersuchten Gene bei der Reifung der Zellwände in den neugebildeten Tochterzellen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *don1* und *don3* Zellen wird beobachtet, dass die Zellwand deutlich dicker ist und auch einen anderen Aufbau aufweist als in Wildtyp-Zellen (M. Bölker, persönliche Mitteilung). Dies deutet darauf hin, dass die Cdc42 Signalweg nicht nur die Bildung des sekundären Septums reguliert, sondern im Abschluss der Zellteilung vermutlich auch die Ausreifung der Tochterzellwand steuert.

Die Rolle von Cdc42 in der Zellwandreifung zeigen auch die Untersuchungen an den dominant negativen Allelen von Cdc42. Cdc42^{T17N} und auch Cdc42^{V44A} exprimierende Wildtyp-Zellen zeigten im Gegensatz zu nicht exprimierenden Zellen verdickte Zellwände.

23. Regulation der Zellpolarität

Cdc42 zeigte seine regulierende Funktion außer in der Bildung des sekundären Septums und in der Zellwandreifung auch in der Regulation der Zellpolarität. In *U. maydis* führte die Expression von *cdc42* Mutationen im Gegensatz zu Hefe nicht zur Letalität und dominant aktive und negative Mutanten zeigen unterschiedliche Phänotypen. Beide scheinen aber Störungen in der Positionierung der Knospe und in dem polaren Wachstum aufzuweisen: Während die konstitutiv aktiven Cdc42^{G12V} und Cdc42^{Q61L} Varianten eine lang gestreckte, hyperpolarisierte Zellmorphologie verursachen, führt dominant negatives Cdc42^{T17N} zum Verlust der Polarität und die Zellen bilden ihre Knospen an den falschen Stellen. Diese Daten zeigen die wichtige Rolle von Cdc42 in der Aufrechthaltung der Polarität auch in *U. maydis*, was auch in anderen Organismen bereits gezeigt werden konnte.

In *S. cerevisiae* führt die Expression der konstitutiv aktiven Cdc42^{G12V} oder Cdc42^{Q61L} zu Letalität, die Mutanten bildeten große Zellen mit mehreren Knospen und zeigten eine Störung des kortikalen Aktin-Cytoskeletts. Dieser Phänotyp zeigt, dass die mutierten Proteine konstitutiv mit ihren downstream Effektoren interagierten und eine falsche Polarisierung des Aktin-Cytoskeletts verursachten (Ziman *et al.*, 1991).

Die Expression des dominant negativen Cdc42^{D118A} führte in *S. cerevisiae* zur Bildung großer, runder Zellen, die keine Knospen bildeten (Johnson, 1999). Die gleiche Cdc42^{D118A} Mutation in *S. pombe* verursachte überraschenderweise einen dominant aktiven Phänotyp und zeigte ähnliche morphologische Veränderungen, wie die Cdc42^{G12V} und Cdc42^{Q61L} Mutanten:

Während die dominant aktiven Mutanten vergrößerte, runde Zellenmorphologie mit delokalisierten Aktin Flecken zeigten, waren dominant negative Zellen klein und rund. Diese Mutationen verursachten im Gegensatz zu der Hefe keine Letalität in *S. pombe* (Miller and Johnson, 1994).

Cdc42 -abhängige Prozesse in der Hefe und in Säugerzellen

Das hochkonservierte Protein Cdc42 spielt eine regulierende Rolle bei vielen verschiedenen Prozessen, wie der Transkriptionellen-Antwort auf extra- und intrazellulären Signale, der Reorganisierung des Aktin-Cytoskeletts oder das polarisierte Wachstum. Die molekulare Charakterisierung der Zellpolarität ist in *S. cerevisiae* am weitesten fortgeschritten. Experimente in *S. pombe*, *Drosophila*, *Cenorhabditis* und Säugerzellen weisen darauf hin, dass die molekularen Mechanismen, die in der Hefe die Zellpolarität regulieren, unter den Eukaryonten hochkonserviert sind (Johnson, 1999).

Neben der Zellpolarität ist Cdc42 in *S. cerevisiae* auch bei der Steuerung der Pheromon-Antwort, filamentöses und polarisiertes Wachstum beteiligt. Die Pheromonantwort in der Hefe ist ein sehr gut charakterisierter Prozess und es konnte gezeigt werden, dass Cdc42p mit Ste20p, einer PAK-ähnlichen Kinase interagiert, die an der Pheromon-Antwort beteiligt ist. Diese Beobachtung wies darauf hin, dass Cdc42p selber eine direkte Rolle in der Pheromon-Antwort spielen könnte. Allerdings wird dies durch Untersuchungen in Frage gestellt, die zeigte, dass die Cdc42 bindende CRIB-Domäne von Ste20p entfernt werden kann, ohne einen großen Verlust der Interaktion mit Cdc42p, nur kleinen Einfluss auf die Pheromon-Signalkaskade und auf die Bildung von Mating Projektionen auszuüben (Leberer *et al.*, 1997a; Peter *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass Cdc42p und sein GEF Cdc24p eher nur in der polarisierten Ablagerung von sekretorischen Vesikeln für die Mating Projektions eine Rolle spielt, die an der Zellfusion beteiligt ist. (Mackay and Hall, 1998).

24. *cla4* kodiert einen neuen Effektoren von Cdc42 in *U. maydis*

In dieser Arbeit gelang es eine der neu isolierten Mutanten, die in der Zellmorphologie und Cytokinese gestört sind, molekular zu charakterisieren. Durch Komplementation der *cla4* Mutante konnte eine Proteinkinase identifiziert werden. Das Cla4 Protein zeigte hohe Homologien zu der Ste20 alpha Kinase von *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* und zu den Cla4 Proteinkinasen in anderen Pilzen, die als Effektoren der Rho/Rac/Cdc42 kleinen

GTPasen bekannt sind und in die PAK Subfamilie der Ste20-ähnlichen Proteinkinasen gehören (**Abbildung 69**).

Die Cla4 Proteinkinase wurde in mehreren Organismen charakterisiert. Das Protein enthält eine C-terminale Kinase Domäne für die Phosphorylierung der Effektoren, eine N-terminale CRIB Domäne für die Interaktion mit der kleinen GTPase Cdc42 und eine PH Domäne, die für die Membranbindung verantwortlich ist. Zu den Ste20-ähnlichen Kinasen gehört auch das Don3 Protein, das aber keine Interaktionsdomäne für Cdc42 (CRIB) enthält und damit in die andere Subfamilie der Germinal Center Kinasen (GCKs) gehört (**Abbildung 69**).

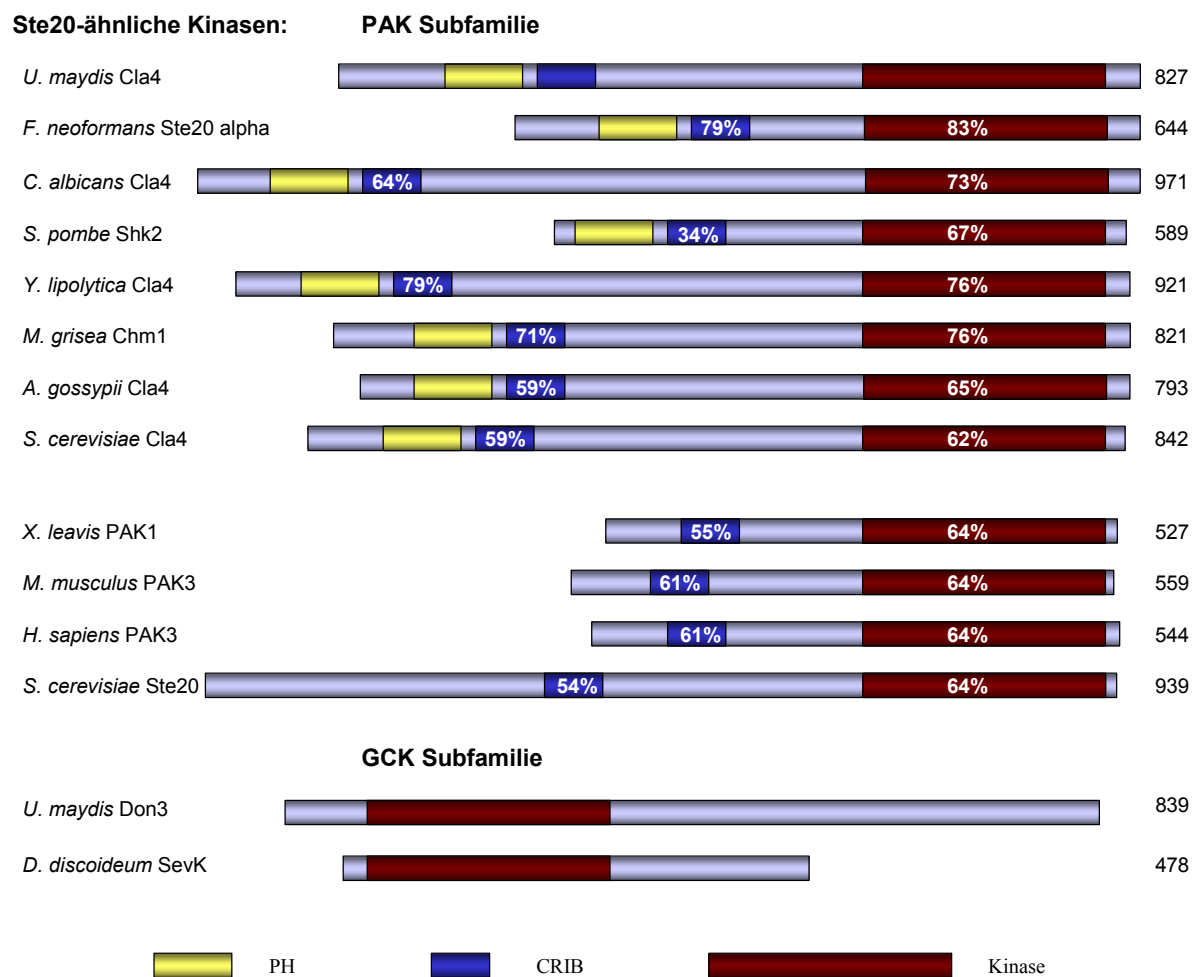


Abbildung 69: Homologien der Cla4 Proteinkinase Domänen in anderen Organismen aus der PAK Subfamilie der Ste20-ähnlichen Proteinkinase Familie. Das UmCla4 Protein zeigt die höchste Homologie zu Cla4 Proteinen aus der PAK Subfamilie der Ste20-ähnlichen Proteinkinasen. Im Gegensatz zu Don3 enthält es eine CRIB Domäne für die Bindung zu Cdc42. Don3 besitzt nur eine N-terminale Kinase Domäne und gehört damit in die GCK Subfamilie der Ste20-ähnlichen Proteinkinasen.

Das *cla4* Gen wurde zuerst in einem Screen auf Mutanten in der Hefe isoliert, die in der Abwesenheit von den CLN1 und CLN2 G₁ Cyclinen nicht mehr lebensfähig waren (Cla4, Cln activity dependent) (Benton *et al.*, 1993; Cvrckova *et al.*, 1995). Die *cla4* Mutante zeigte überraschenderweise einen Defekt in der Cytokinese, die im Zellzyklus als letzter Schritt erfolgt. Denn die Cycline, die synthetische Letalität mit Cla4 zeigten, üben in einer frühen Phase des Zellzyklus ihre Funktion aus. Dies wies darauf hin, dass der Cytokinese-Defekt der *cla4* Mutante eine späte Konsequenz eines frühen Defekts sein könnte (Cvrckova *et al.*, 1995).

Während die Δ *cla4* und die Δ *ste20* Mutanten alleine lebensfähig sind, war die Δ *cla4* Δ *ste20* Doppelmutante letal (Cvrckova *et al.*, 1995), was darauf hindeutet, dass Cla4p und Ste20p eine überlappende, essenzielle Funktion in der Hefe haben. Untersuchungen haben gezeigt, dass Cla4p und Ste20p beide die head Domäne von Myo3p Myosine I heavy-chain Protein in *S. cerevisiae* phosphorylieren können (Wu *et al.*, 1997a). Ein Myo3^{S357D} Allele, welches der phosphorylierten Form von Myo3p funktionell gleicht, konnte aber die Letalität nicht suprimieren, was vermuten lässt, dass Myo3p nicht das physiologisch wichtigste Substrat für Cla4p und Ste20p sein kann (Johnson, 1999).

Die Zerstörung der CRIB oder PH Domäne in Cla4p führte in *S. cerevisiae* zu einem nicht-funktionierenden oder nur zum Teil funktionierenden Protein (Benton *et al.*, 1997), die Deletion der Kinase Domäne verursachte morphologische Defekte (Cvrckova *et al.*, 1995). Die Cla4p Kinase Aktivität ist Zellzyklus-reguliert und zeigt den höchsten Wert während G₂/M Phasen. Diese Regulation ist abhängig von der Bindung zu Cdc42p, da Δ CRIB Cla4p eine solche Zellzyklus-Kontrolle nicht zeigte (Altman and Kellogg, 1997; Carroll *et al.*, 1998; Longtine *et al.*, 1998; Tjandra *et al.*, 1998).

24.1. Aktivierung von Ste20-ähnlichen Kinasen durch Cdc42

Hinweise dafür, auf welche Weise die Aktivierung Proteinkinasen mit der CRIB-Motif durch Rac/Cdc42 Proteine verläuft, haben NMR-Untersuchungen und Mutationsanalysen gezeigt. Die Aktivierung scheint in der Zerstörung intramolekularer autoinhibitorischer Interaktionen durch Bindung des GTP-gebundenen Cdc42 an die CRIB Domäne zu liegen, wobei die Kinase Domäne innerhalb des Effektorproteins freigesetzt wird (**Abbildung 70**) (Bishop and Hall, 2000).

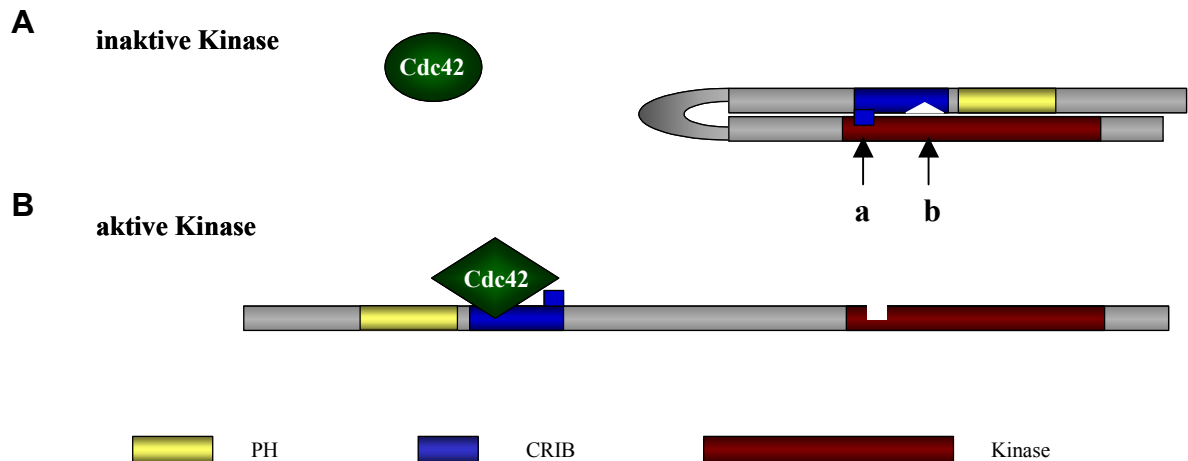


Abbildung 70: Regulation der Kinase Aktivität in der PAK Subfamilie der Ste20-ähnlichen Proteinkinasen. (A) In der Abwesenheit der GTPase befindet sich die Kinase wegen der Autoinhibition in ihrer inaktiven Form (B) Bindung der GTPase setzt die Kinase Domäne frei **Blau:** CRIB Domäne **Rot:** Kinase Domäne **Gelb:** PH Domäne **Grün:** Cdc42 **a:** inhibitorische Subdomäne **b:** Subdomäne, verantwortlich für die Bindung zu Cdc42.

Aufgrund der Domänenstruktur des Cla4 Proteins in *U. maydis* kann vermutet werden, dass die Aktivierung des Proteins in der selben Weise reguliert wird. Die CRIB und die Kinase Domänen können so für die Funktion von Cla4, die PH Domäne jedoch für seine Lokalisierung notwendig sein.

24.2. Die Rolle von Cla4 während der Cytokinese in *U. maydis*

Regulation der Chitin-Ablagerung in der Zellwand, Septierung und Cytokinese

Zellbiologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass *cla4* Zellen eine verdickte Zellwand bildeten und ein irreguläres Septum aufweisen: Die Region war im Durchmesser genauso breit wie die anderen Stellen der Zelle und es konnte nicht unterschieden werden, welches die Tochter- und welches die Mutterseite des Septums ist. Auf beiden Seiten des Septums konnten irreguläre Membranstrukturen, aber keine deutliche Fragmentierungszone beobachtet werden, was die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit dem FM4-64 Farbstoff bestätigt werden. Auch die $\Delta cla4$ Mutante von *Yarrowia lipolytica* und *Ashbya gossypii* weist abnormal dicke Chitin-Ablagerungen über die gesamte Zellwand auf. Dies weist auf eine ähnliche Funktion von Cla4 in diesen Pilzen hin (Ayad-Durieux *et al.*, 2000; Szabo, 2001). Der Ablagerungsdefekt von Zellwandmaterialien in

der *Umcla4* Mutante konnte durch die Expression des konstitutiv aktiven Cdc42^{Q61L} Protein nicht gerettet werden, somit wird dieser Prozess vermutlich über Cla4 reguliert.

Lokalisierung des Cla4 Proteins

Um mehr über die Funktion des Cla4 Proteins im Zellzyklus zu erfahren, wurde ein Cla4-GFP Fusionsprotein hergestellt und seine Lokalisierung in Wildtyp-Zellen untersucht. Das GFP-Signal war in haploiden Zellen an der Stelle der zukünftigen Knospenbildung zu sehen, in knospenden Zellen wurde das Protein an der wachsenden Spitze in der Tochterzelle gefunden und kurz vor der Septumbildung war Cla4 an dem Mutter-Tochter-Hals zu beobachten. Die Lokalisierung des Cla4 Proteins wurde außer in haploiden Zellen auch in dikaryotischen Luftmyzelien untersucht und es wurde dort ebenfalls an der Spitze des Myzels gefunden. Diese Beobachtungen zeigen, dass das Cla4 Protein vermutlich am polarisierten Wachstum beteiligt ist, sowohl in haploiden als auch in dikaryotischen Zellen.

In *S. cerevisiae* und *A. gossypii* konnte Cla4 nicht am Septum lokalisiert werden, obwohl Cla4 bei der Bildung des Aktin- und Chitin-Ringes am Septum beteiligt ist (Ayad-Durieux *et al.*, 2000; Holly and Blumer, 1999). Cla4 lokalisierte jedoch in beiden Organismen an den wachsenden Zellspitzen.

Polarisierung des Aktin-Cytoskeletts

In *S. cerevisiae* haben Untersuchungen gezeigt, dass das Cdc42p Protein die Polarisation des Aktin-Cytoskeletts reguliert (Ziman *et al.*, 1993). Da das Cdc42 Protein in *U. maydis* wahrscheinlich in zwei unabhängigen Kaskaden (Don1/Cdc42/Don3 und Cdc42/Cla4) eine zentrale Rolle spielt, war es interessant zu untersuchen, über welche Kaskade die Organisation des Aktin-Cytoskeletts erfolgt. Immunostaining von Aktin in *don1* Zellen zeigten, dass eine polarisierte Lokalisierung von Aktin an der distal wachsenden Knospenspitze zu beobachten war. Außerdem lokalisierten Aktin Flecken an der Mutterseite des primären Septums in den Strukturen. Diese Verteilung entspricht der, die auch in Wildtyp-Zellen beobachtet wird. In *cla4* Einzelzellen, die unpolarisiert in beiden Richtungen wuchsen, konnte Aktin an beiden Enden der Zelle beobachtet werden. In den aus mehreren Zellen bestehenden Strukturen wurde Aktin jedoch immer nur an den distalen Enden aber nie an den Septen beobachtet, was auf einen Defekt in der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts zum Septum zurückzuführen sein könnte. Dies weist darauf hin, dass Cdc42 über Cla4 für diese Reorganisation verantwortlich ist, an der die Don Proteine nicht beteiligt sind.

Regulation der Septin-Organisation

Mehrere Septin-interagierende Proteine wurden in der Hefe identifiziert, die in der Knospenbildung, in der Cytokinese und in der Bestimmung der Stelle der Knospenbildung eine Rolle spielen (Field and Kellogg, 1999; Lew and Reed, 1995a, b; Sanders and Field, 1995). Das Septin Netzwerk interagiert in der Hefe mit zwei Kinasen, Gin4p und Hsl1p. Gin4p und die Septine sind abhängig voneinander in ihrer Lokalisierung an dem Mutter-Tochter-Hals. Mehrere andere Proteine werden für die Mitose-spezifische Aktivierung von Gin4p benötigt, darunter befindet sich auch Cla4 und Cdc42 (Altman and Kellogg, 1997; Tjandra *et al.*, 1998). Die Septin-Lokalisierung in *cla4* Mutanten lässt vermuten, dass dieses Protein für die laterale Interaktion zwischen Septin-Filamenten nötig ist, die für die Bildung des Septin Ringes verantwortlich sind. Ohne diese Faktoren und Interaktionen bilden die Septin Filamente zusammenklebend 5 bis 8 dickere Bündel (Longtine *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen zeigen auch eine direkte, physikalische Interaktion zwischen der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28p und Cla4p in *S. cerevisiae* (Mitchell and Sprague, 2001). Außerdem verursachte die *cla4* Mutation und die *cdc12* Septin Mutation zusammen synthetische Letalität und die Lokalisierung des Septin-Ringes war in der *cla4* Mutante gestört (Cvrckova *et al.*, 1995). Untersuchungen zeigen, dass die primäre Rolle von Cla4 die Regulation der Cytokinese durch Interaktionen mit Cdc42p und Septins sein kann (Johnson, 1999).

Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde in dieser Arbeit auch die Rolle eines in *U. maydis* bekannten Septins (Cdc10) in den *don1*-, *don3*-Mutanten und in den neu isolierten Mutanten untersucht. Mikroskopische Untersuchungen der Cdc10-GFP Lokalisierung zeigten, dass in den *don1*, *don3* und *don6* Mutanten für die Organisation des Septin-Netzwerks normal ist. Die Lokalisierung des Cdc10 Proteins konnte in der *cla4* Mutante nicht erfolgen, da es trotz vielfacher Versuche nicht gelang, das Cdc10-GFP-Fusionsprotein in *cla4*-Mutanten zu exprimieren. Außerdem wurde die Lokalisierung des Cla4 Proteins in FB1 Δ *cdc10* Zellen untersucht. Die Expression des Cla4-GFP Fusionskonstruktes verursachte in FB1 Δ *cdc10* Zellen eine ausgesprochen abgerundete Morphologie der Zellen, die voneinander nicht getrennt werden konnten und verzweigte, Perlenketten-ähnliche Strukturen bildeten. Das Cla4-GFP Signal war diffus in der ganzen Zelle oder unter der Zellwand in den Zellen zu sehen, wo diese aktiv gewachsen sind, das Protein war aber nicht an den Spitzen der Zellen zu beobachten, wo sie ihre nächste Knospen bildeten. Diese Beobachtungen und die Vermutung, dass das mutierte Cla4 Protein und die Überexpression des Cdc10 Proteins zusammen zur

synthetischen Letalität führen würde, könnte auf eine Interaktion der Cla4 und Cdc10 Proteine in *U. maydis* hindeuten.

24.3. Missense Mutation in der Kinase Domäne von Cla4 führt zu seiner Fehlfunktion

Um mehr über die Mutation in dem *cla4⁻* Allel und ihre Auswirkung auf die Funktion zu erfahren, wurde die Kinase Domäne und ein Teil der CRIB Domäne von *cla4* sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte, dass die CRIB Domäne keine Mutation in sich trug, die Kinase-Domäne enthielt jedoch einen Basenaustausch, der zu einer missense Mutation führte. Die Aminosäure Leucin an der Position 637, die sich in der ATP-Bindetasche der Kinase Domäne befindet, war gegen Prolin ausgetauscht.

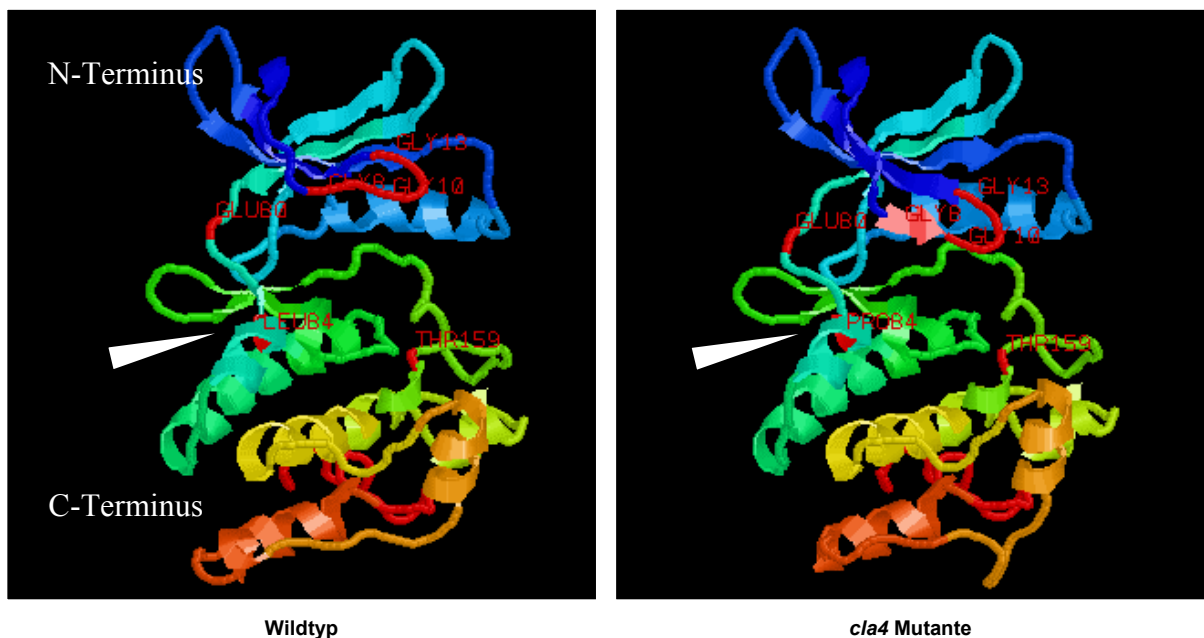


Abbildung 71: Hypothetische 3D Struktur der Kinase Domäne von Cla4. In der hypothetischen 3D Darstellung der Kinase Domäne ist eine leichte Strukturänderung in der mobilen Glycin-Schleife (Gly⁸, Gly¹⁰, Gly¹³) zwischen der Wildtyp- und *cla4* Struktur von Cla4 zu sehen. Die Aminosäure Leucin an der Position 84 (637 im ganzen Protein betrachtet) wurde mit Prolin ausgetauscht (weißer Pfeil).

Der Aufbau der Kinase-Domäne ist in PAK-Kinasen konserviert. Der N-terminale Teil der Domäne besteht aus fünf β -Falten und aus einer α -Helix, der größere C-terminale Teil aus sechs Helices und aus zwei kurzen β -Falten. Solange sich die ATP-Bindetasche zwischen den N- und C-terminalen Teilen befindet, liegt das zu phosphorylierende Peptid-Substrat an dem C-terminalen Teil. Das hier konservierte Threonin (Thr¹⁵⁹) ist spezifisch für die Erkennung

des zu phosphorylierenden Serins. Die N- und C-terminalen Teile sind mit einer kurzen Sequenz zusammengebunden, die aus wenigen Aminosäuren besteht. Die mobile Glycin-Schleife (Gly⁸, Gly¹⁰, Gly¹³) zwischen zwei N-terminalen β -Falten ist verantwortlich für die Positionierung der Phosphate des ATP Moleküls (Abbildung 51) (Johnson *et al.*, 1998). Der L637P Aminosäuren-Austausch im *cla4⁻* Allel liegt an dem C-terminalen Ende vom verbindenden Gelenk. Das Prolin verursacht aufgrund seiner Ringstruktur wahrscheinlich einen Knick in der Peptidkette und führt damit zu einer Strukturveränderung, die die ATP-Bindetasche blockiert. Dies könnte dazu führen, dass die Cla4-Kinase ihre Funktion nicht oder nur beschränkt ausführen kann. Ob das mutierte Protein nicht funktionell ist oder die Mutation nur zu einem schwachen Allel führte, die noch über Restfunktionen verfügt, konnte die Konstruktion einer *cla4*-Nullmutante beantworten. Die Konstruktion einer solchen *cla4*-Nullmutante gelang trotz vielfacher Versuche nicht, was darauf hindeutet, dass die Cla4 Kinase eine essentielle Funktion ausübt, die in der *cla4^{L637P}* Mutante nicht vollständig zerstört ist.

25. Cdc42-Signalisierungskaskaden in *U. maydis*

Die Ergebnisse der Arbeit weisen darauf hin, dass in *U. maydis* Cdc42 in mindestens zwei Kaskaden eine Rolle spielt. Es konnte durch eine Epistasis-Analyse bestätigt werden, dass Don1 und Don3 tatsächlich über Cdc42 die Bildung des sekundären Septums reguliert. Cdc42 ist in dieser Kaskade verantwortlich für die Bildung eines sekundären Septums. Zwei der neu isolierten Cytokinese-Mutanten (*don4*, *don5*) könnten möglicherweise ebenfalls in diese Kaskade eingeordnet werden. Diese Mutanten weisen Störungen in der Vesikel-Sortierung eventuell wegen eines Mangels an PI(3)P an den Endosomen-Membranen (**Abbildung 72, A**).

Die zellbiologische und molekularbiologische Charakterisierung der *don6* Mutante weist darauf hin, dass das betroffene Gen vermutlich mit *cdc42* allelisch ist oder einen Effektor kodiert, dessen Cytokinese-Defekt in der *don6* Mutante durch die Überexpression von Cdc42 gerettet werden könnte. Dies zu entscheiden werden weitere Experimente benötigt.

Während die Don1/Cdc42/Don3 Kaskade für die Bildung des sekundären Septums verantwortlich ist, konnte gezeigt werden, dass eine weitere Cdc42-Kaskade für das polarisierte Wachstums verantwortlich ist. In dieser Kaskade spielt das Cla4 Protein eine Rolle. Das Cla4 Protein war an den wachsenden Spitzen sowohl in haploiden, als auch in

dikaryotischen Zellen zu finden, wurde jedoch nicht für die Fusion kompatibler Zellen benötigt.

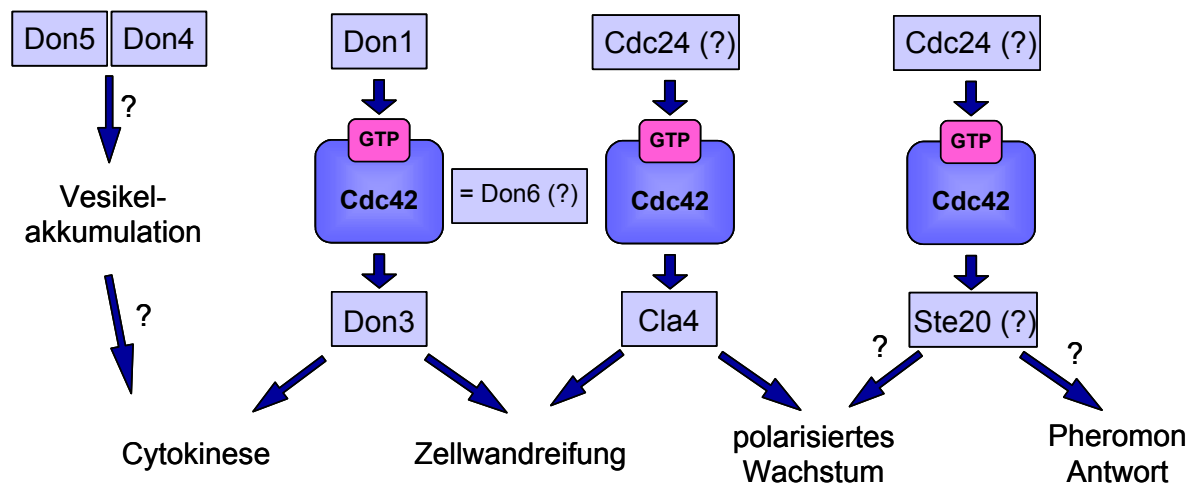


Abbildung 72: Cdc42 Signalisierungskaskaden in *U. maydis*. Solange die Don1/Cdc42/Don3 Kaskade für die Bildung des sekundären Septums verantwortlich ist, spielt das Cla4 Protein eine Rolle im polarisierten Wachstum. Homologien in der Hefe lassen die Rolle von Cdc24 in den Cla4- und Ste20-Kaskaden vermuten. Die *don4* und *don5* Gene könnten unterhalb von Cdc42 oder in einer Cdc42-unabhängigen Kaskade eine Rolle spielen. *don6* könnte möglicherweise mit *cdc42* allelisch sein, dies könnten jedoch nur weitere Experimente bestätigen.

Welche Aktivatoren von Cdc42 in *U. maydis* die Aktivierung des Cla4 Proteins auslösen, ist bisher nicht bekannt. In der Hefe wurde Cdc24p, ein GEF für Cdc42, in der Cla4 Kaskade identifiziert. Das Cdc24p Protein in Hefe hat eine essentielle Funktion (Coleman *et al.*, 1986), die temperatursensitive Variante von Cdc24p zeigt bei der restriktiven Temperatur delokalisierte Chitin-Ablagerungen, Störungen in der Auswahl der Knospungsstelle (Sloat and Pringle, 1978; Sloat *et al.*, 1981), im polarisierten Wachstum und im Mating (Nern and Arkowitz, 1998; Reid and Hartwell, 1977). Das Protein lokalisiert unter der Plasmamembran an der Stelle der Knospenbildung und an der Stelle der Septumbildung zwischen Mutterzellen und ihren größeren Knospen (Johnson, 1999). Die Defekte der *cdc24^{ts}* Mutante und die Lokalisierung des Proteins zeigen eine Ähnlichkeit zu den Defekten der *cla4* Mutante von *U. maydis* und zu der Lokalisierung des Cla4 Proteins. Dies deutet auf die Funktion eines Cdc24 Homologs für die Aktivierung der Cla4 Kinase hin (**Abbildung 72, B**). Die *cla4*, *don1* und *don3* Mutanten zeigen keinen Defekt im Mating, kompatible Zellen sind weiterhin fähig Konjugationsschläuche zu bilden und zu fusionieren. Dies weist darauf hin, dass es noch einen weiteren Effektor von Cdc42 außer Don3 und Cla4 in *U. maydis* geben muss, der diese Prozesse reguliert. Der beste Kandidat dafür wäre das Ste20 Protein, das in der Hefe schon als

Effektor von Cdc42 in der Pheromon-Antwort und in Mating identifiziert wurde. Das Ste20 Protein in *U. maydis* wurde kürzlich isoliert und zeigt Sequenzhomologien mit dem Cla4 Protein. Seine Rolle wurde jedoch noch nicht näher untersucht (**Abbildung 72, C**).

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F., and Pringle, J.R. (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **111**: 131-142.
- Altman, R., and Kellogg, D. (1997) Control of mitotic events by Nap1 and the Gin4 kinase. *J Cell Biol* **138**: 119-130.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Amberg, D. (1998) Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cycle. *Mol Biol*: 3259-3262.
- Ausubel, F.M., Brenz, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Strukl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Ayad-Durieux, Y., Knechtle, P., Goff, S., Dietrich, F., and Philippsen, P. (2000) A PAK-like protein kinase is required for maturation of young hyphae and septation in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *J Cell Sci* **113 Pt 24**: 4563-4575.
- Ayscough, K., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., and Drubin, D. (1997) High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* **137**.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1989) Different *a* alleles are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5878-5882.
- Banuett, F. (1992) *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* **8**: 174-180.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1994) Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* **8**: 1367-1378.
- Banuett, F. (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**: 179-208.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976.
- Bender, A., and Pringle, J.R. (1989) Multicopy suppression of the *cdc24* budding defect in yeast by CDC42 and three newly identified genes including the ras-related gene RSR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9976-9980.
- Benton, B.K., Tinkelenberg, A.H., Jean, D., Plump, S.D., and Cross, F.R. (1993) Genetic analysis of *Cln/Cdc28* regulation of cell morphogenesis in budding yeast. *Embo J*: 5267-5275.

- Benton, B.K., Tinkelenberg, A., Gonzalez, I., and Cross, F.R. (1997) Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis. *Mol Cell Biol* **17**: 5067-5076.
- Bi, E., Maddox, P., Lew, D.J., Salmon, E.D., McMillan, J.N., Yeh, E., and Pringle, J.R. (1998) Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol* **142**: 1301-1312.
- Bi, E. (2001) Cytokinesis in budding yeast: the relationship between actomyosin ring function and septum formation. *Cell Struct Funct*: 529-537.
- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**: 241-255.
- Blencowe, B.J. (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* **25**: 106-110.
- Boguski, M.S., and McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**: 643-654.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**: 125-132.
- Brachmann, A. (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE Heterodimer. *München, Dissertation der Fakultät für Biologie*.
- Burbelo, P.D., Drechsel, D., and Hall, A. (1995) A Conserved Binding Motif Defines Numerous Candidate Target Proteins for Both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* **270**: 29071-29074.
- Cabib, E., Roh, D.-H., Schmidt, M., Crotti, L.B., and Verma, A. (2001) The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem*: 19679-19682.
- Carroll, C.W., Altman, R., Schieltz, D., Yates, J.R., and Kellogg, D. (1998) The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. *J Cell Biol* **143**: 709-717.
- Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* **3**: 285-298.
- Casey, P.J., and Seabra, M.C. (1996) Protein Prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **271**: 5289-5292.
- Chang, F., and Nurse, P. (1996) How fission yeast fission in the middle. *Cell* **84**: 191-194.
- Chant, J., and Pringle, J.R. (1991) Budding and cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* **1**: 342-350.
- Christensen, J.J. (1963) Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.

- Cid, V., Adamikova, L., Sanchez, M., Molina, M., and Nombela, C. (2001) Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiology* **147**: 1437-1450.
- Coleman, K.G., Steensma, H.Y., Kaback, D.B., and Pringle, J.R. (1986) Molecular cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and characterization of the CDC24 gene and adjacent regions of the chromosome. *Mol Cell Biol* **6**: 4516-4525.
- Cvrckova, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, J.R., and Nasmyth, K. (1995) Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev* **9**: 1817-1830.
- Davis, C.R., Richman, T.J., Deliduka, S.B., Blaisdell, J.O., Collins, C.C., and Johnson, D.I. (1998) Analysis of the mechanisms of action of the *Saccharomyces cerevisiae* dominant lethal cdc42G12V and dominant negative cdc42D118A mutations. *J Biol Chem* **273**: 849-858.
- Day, P.R., and Anagnostakis, S.L. (1971) Corn smut dikaryon in culture. *Nat New Biol* **231**: 19-20.
- De Matteis, M.A., Godi, A., and Corda, D. (2002) Phosphoinositides and the Golgi complex. *Curr Opin Cell Biol*: 434-447.
- Douglas, S.E. (1995) DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol* **3**: 37-45.
- Drubin, D.G. (1991) Development of cell polarity in budding yeast. *Cell* **65**: 1093-1096.
- Drubin, D.G., and Nelson, W.J. (1996) Origins of cell polarity. *Cell* **84**: 335-344.
- Dyer, K., and Rosenberg, H.F. (1995) Isolation of homologous gene sequences by vectorette cloning. *BioTechniques* **19**: 550-551.
- Esser, K. (1976) *Kryptogamen*: Springer-Verlag.
- Field, C.M., and Kellogg, D. (1999) Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol* **9**: 387-394.
- Fishkind, D.J., and Wang, Y.L. (1995) New horizons for cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 23-31.
- Fukui, K., Sasaki, T., Imazumi, K., Matsuura, Y., Nakanishi, H., and Takai, Y. (1997) Isolation and Characterization of a GTPase Activating Protein Specific for the Rab3 Subfamily of Small G Proteins. *J. Biol. Chem.* **272**: 4655-4658.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A., and Takai, Y. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* **5**: 1321-1328.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, M., and Kahmann, R. (1992) A two-component regularoty system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647-657.

- Gladfelter, A.S., Pringle, J.R., and Lew, D.J. (2001) The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr Opin Microbiol* **4**: 681-689.
- Glotzer, M. (1997) The mechanism and control of cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 815-823.
- Gould, K.L., and Simanis, V. (1997) The control of septum formation in fission yeast. *Genes Dev* **11**: 2939-2951.
- Gulli, M., Jaquenoud, M., Shimada, Y., Niederhauser, G., Wiget, P., and Peter, M. (2000) Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol Cell* **6**: 1155-1167.
- Haarer, B.K., and Pringle, J.R. (1987) Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Cell Biol* **7**: 3678-3687.
- Hall, A. (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**: 635-640.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation in *E. coli*. In *In DNA cloning, a practical approach*. Rickwood, D. and Hames, B.D. (eds): IRL Press, pp. 109-135.
- Hancock, J.F., Paterson, H., and Marshall, C.J. (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**: 133-139.
- Hengen, P. (1995) Vectors, splinkerettes and boomerang DNA amplification. *TIBS* **20**: 372-373.
- Holliday, R. (1961) The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **2**: 204-230.
- Holly, S.P., and Blumer, K.J. (1999) PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*: 845-856.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (1990) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, USA: Academic Press.
- Jacobs, C.W., Mattichak, S.J., and Knowles, J.F. (1994) Budding patterns during the cell cycle of the maize smut pathogen *Ustilago maydis*. *Can J Bot.* 1675-1680.
- Johnson, B.F., Yoo, B.Y., and Calleja, G.B. (1973) Cell division in yeasts: movement of organelles associated with the cell-plate growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol.* 358-366.
- Johnson, D.I., and Pringle, J.R. (1990) Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* **111**: 143-152.
- Johnson, D.I. (1993) In *The ras superfamily of GTPases*. Lacal, J.C. and McCormick, F. (eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 297-312.
- Johnson, D.I. (1999) Cdc42: An Essential Rho-Type GTPase Controlling Eukaryotic Cell Polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 54-105.

- Johnson, L.N., Lowe, E.D., Noble, M.E.M., and Owen, D.J. (1998) The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett* **430**: 1-11.
- Jones, S.M., and Howell, K.E. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the formation of constitutive transport vesicles from the TGN. *J. Cell Biol.*: 339-349.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., and Kämper, J. (2000) *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. *Dordrecht, Kluwer Academic Publishers*.
- Knaus, U.G., and Bokoch, G.M. (1998) The p21Rac/Cdc42-activated kinases (PAKs). *Int J Biochem Cell Biol* **30**: 857-862.
- Kranz, A., Kinner, A., and Kölling, R. (2001) A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in yeast. *Mol Biol Cell* **12**: 711-723.
- Leberer, E., Wu, C., Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Segall, J.E., and Thomas, D.Y. (1997a) Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *Embo J* **16**: 83-97.
- Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Marcus, D., Dignard, D., Ash, J., Johnson, L., and Thomas, D.Y. (1997b) Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCla4p. *Curr Biol* **7**: 539-546.
- Lengeler, K.B., Wang, P., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Heitman, J. (2000) Identification of the MATa mating-type locus of *Cryptococcus neoformans* reveals a serotype A MATa strain thought to have been extinct. *PNAS* **97**: 14455-14460.
- Lessard, J.L. (1988) Two monoclonal antibodies to actin: one muscle selective and one generally reactive. *Cell Motil Cytoskeleton* **10**: 349-362.
- Lew, D.J., and Reed, S.I. (1995a) A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J Cell Biol* **129**: 739-749.
- Lew, D.J., and Reed, S.I. (1995b) Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 17-23.
- Lippincott, J., and Li, R. (1998) Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. *J Cell Biol* **140**: 355-366.
- Liu, H.X., Cartegni, L., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2001) A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nature Genetics* **27**: 55-58.
- Longtine, M.S., DeMarini, D.J., Valencik, M.L., Al-Awar, O.S., Fares, H., De Virgilio, C., and Pringle, J.R. (1996) The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 106-119.
- Longtine, M.S., Fares, H., and Pringle, J.R. (1998) Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *J Cell Biol* **143**: 719-736.

- Mabuchi, I., and Okuno, M. (1997) The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J. Cell Biol.*: 251-263.
- Mackay, D.J., and Hall, A. (1998) Rho GTPases. *J Biol Chem* **273**: 20685-20688.
- Mahlert, M. (2002) *Konstruktion und Untersuchung von Mutanten von cdc42 in Ustilago maydis. (Diplomarbeit)*. Marburg: Philipps Universität Marburg.
- Maquat, L.E. (2001) The power of point mutations. *Nature Genetics* **27**: 5-6.
- Marck, C. (1988) DNA Strider: a C program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res* **16**: 1829-1836.
- Mayorga, M.E., and Gold, S.E. (2001) The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Mol Microbiol* **41**: 1365-1379.
- McCallum, S.J., Wu, W.J., and Cerione, R.A. (1996) Identification of a Putative Effector for Cdc42Hs with High Sequence Similarity to the RasGAP-related Protein IQGAP1 and a Cdc42Hs Binding Partner with Similarity to IQGAP2. *J. Biol. Chem.* **271**: 21732-21737.
- Miller, P.J., and Johnson, D.I. (1994) Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **14**: 1075-1083.
- Miller, P.J., and Johnson, D.I. (1997) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *cdc42-1ts* allele and new temperature-conditional-lethal *cdc42* alleles. *Yeast* **13**: 561-572.
- Millis, L.J., and Kotze, J.M. (1981) Scanning electron microscopy of the germination, growth and infection of *Ustilago maydis* on maize. *Phytophth* **102**: 21-27.
- Mitchell, D.A., and Sprague, G.F. (2001) The phosphotyrosyl phosphatase activator, Ncs1p (Rrd1p), functions with Cla4p to regulate the G2/M transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 488-500.
- Mitchison, J.M., and Nurse, P. (1985) Growth in cell length in the fission yeast *Scizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **75**: 357-376.
- Nagata, Y., and Burger, M.M. (1974) Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J. Biol. Chem.* **249**: 3116-3122.
- Nern, A., and Arkowitz, R.A. (1998) A GTP-exchange factor required for cell orientation. *Nature* **391**: 195-198.
- O'Donell, K.L., and McLaughlin, D.J. (1984) Postmeiotic mitosis, basidiospore development, and septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia* **76**: 486-502.
- Park, H.O., Sanson, A., and Herskowitz, I. (1999) Localization of Bud2p, a GTPase-activating protein necessary for programming cell polarity in yeast to the presumptive bud site. *Genes Dev*: 1912-1917.

- Pasteris, N.G., Cadle, A., Logie, L.J., Porteous, M.E., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., Glover, T.W., Wilroy, R.S., and Gorski, J.L. (1994) Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell* **79**: 669-678.
- Percival-Smith, A., and Segall, J. (1986) Characterization and mutational analysis of a cluster of three genes expressed preferentially during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **6**: 2443-2451.
- Peter, M., Neiman, A.M., Park, H.O., van Lohuizen, M., and Herskowitz, I. (1996) Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *Embo J* **15**: 7046-7059.
- Pringle, J., Bi, E., Harkins, H., Zahner, J., De Virgilio, C., Chant, J., Corrado, K., and Fares, H. (1995) Establishment of cell polarity in yeast. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **60**: 729-744.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000) Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* **113**: 365-375.
- Ramberg, J.E., and McLaughlin, D.J. (1980) Ultrastructural study of promycelial development and basidiospore initiation in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **58**: 1548-1561.
- Reid, B.J., and Hartwell, L.H. (1977) Regulation of mating in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **75**: 355-365.
- Richman, T.J., Sawyer, M.M., and Johnson, D.I. (1999) The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast. *J Biol Chem* **274**: 16861-16870.
- Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finniear, R., Jenner, D., Powell, S., Anand, R., Smith, J.C., and Markham, A.F. (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Research* **18**: 2887-2890.
- Ruggieri, R., Bender, A., Matsui, Y., Powers, S., Takai, Y., Pringle, J.R., and Matsumoto, K. (1992) RSR1, a ras-like gene homologous to Krev-1 (smg21A/rap1A): role in the development of cell polarity and interactions with the Ras pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**: 758-766.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanders, S.L., and Field, C.M. (1995) Cell division. Bud-site selection is only skin deep. *Curr Biol* **5**: 1213-1215.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sayle, R.A., and Milner-White, E.J. (1995) RASMOL bimolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci* **20**: 374.

- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., and Kahmann, R. (1990) The *b* alleles of *Ustilago maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain related motif. *Cell* **60**: 295-306.
- Settleman, J., Albright, C.F., Foster, L.C., and Weinberg, R.A. (1992) Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature* **359**: 153-154.
- Simanis, V. (2002) Controlling the onset of cytokinesis in fission yeast. *ISREC Sci. Rep.*: 55-57.
- Simonsen, A., Wurmser, A.E., Emr, S.D., and Stenmark, H. (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 485-492.
- Sloat, B.F., and Pringle, J.R. (1978) A mutant of yeast defective in cellular morphogenesis. *Science* **200**: 1171-1173.
- Sloat, B.F., Adams, A., and Pringle, J.R. (1981) Roles of the CDC24 gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* **89**: 395-405.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**: 193-203.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. (1993) Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**: 843.
- Snetselaar, K.M., amp, ouml, lker, M., and Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol* **20**: 299-312.
- Staehelin, L.A., and Hepler, P.K. (1996) Cytokinesis in higher plants. *Cell* **84**: 821-824.
- Steinberg, G., Wedlich-Soldner, R., Brill, M., and Schulz, I. (2001) Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci* **114**: 609-622.
- Stenmark, H., Aasland, R., and Driscoll, P.C. (2002) The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS Lett* **513**: 77-84.
- Surana, U., Yeong, F.M., and Lim, H.H. (2002) MEN, destruction and separation: mechanistic links between mitotic exit and cytokinesis in budding yeast. *BioEssays*: 659-666.
- Szabo, R. (2001) Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. *Mol Genet Genomics* **265**: 172-179.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-Binding Proteins. *Physiol. Rev.* **81**: 153-208.
- Tjandra, H., Compton, J., and Kellogg, D. (1998) Control of mitotic events by the Cdc42 GTPase, the Clb2 cyclin and a member of the PAK kinase family. *Curr Biol* **8**: 991-1000.

- Trahey, M., and McCormick, F. (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**: 542-545.
- Ványk, K. (1987) *Illustrated genera of smut fungi*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Vida, T.A., and Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* **128**: 779-792.
- Walther, J.M. (1934) The Mode of entrance of *Ustilago zeae* into corn. *Phytopathol* **24**: 1012-1220.
- Wedlich-Soldner, R., Straube, A., Friedrich, M.W., and Steinberg, G. (2002) A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *Embo J* **21**: 2946-2957.
- Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G., and Bölker, M. (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **45**: 219-231.
- Wu, C., Lytvyn, V., Thomas, D.Y., and Leberer, E. (1997a) The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *J Biol Chem* **272**: 30623-30626.
- Wu, W.J., Leonard, D.A., R, A.C., and Manor, D. (1997b) Interaction between Cdc42Hs and RhoGDI is mediated through the Rho insert region. *J Biol Chem* **272**: 26153-26158.
- Yang, P., Kansra, S., Pimental, R.A., Gilbreth, M., and Marcus, S. (1998) Cloning and characterization of shk2, a gene encoding a novel p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* **273**: 18481-18489.
- Zhang, F.L., and Casey, P.J. (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**: 241-269.
- Zheng, Y., Cerione, R., and Bender, A. (1994) Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J Biol Chem* **269**: 2369-2372.
- Ziman, M., O'Brien, J.M., Ouellette, L.A., Church, W.R., and Johnson, D.I. (1991) Mutational analysis of CDC42Sc, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Cell Biol* **11**: 3537-3544.
- Ziman, M., Preuss, D., Mulholland, J., O'Brien, J.M., Botstein, D., and Johnson, D.I. (1993) Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Biol Cell* **4**: 1307-1316.

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

Isolierung von Cytokinesemutanten in *Ustilago maydis* und molekularbiologische Charakterisierung des *cla4*-Gens

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Bölker, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an einem so spannenden Thema Teil haben zu dürfen. Mit so einer Begeisterung, die er hat, wünsche ich mir, auch durch das Leben zu gehen. Besonders danke ich für die viele Unterstützung in meinem wissenschaftlichen Werdegang und die Geduld in der letzten Phase.

Bei meinen Laborkollegen der AG Bölker und AG Klein möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit bedanken. Vor allem danke ich Marisa und Katja für die tolle Zeit, die ich sehr vermissen werde: Wir sind zusammen durch dick und dünn gegangen. Marisa danke ich besonders auch für die hergestellten Konstrukte, die ich während meiner Arbeit benutzen konnte.

Ich danke Frau Böttner, dass sie in den schwierigen Zeiten wie eine Mama für uns alle da war. Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich so weit weggehen ließen und mich immer unterstütz haben, und ich danke Alfred, dass er bei der Korrektur meiner Arbeit so viel geholfen hat.

Lebenslauf

Zur Person

Leonóra Leveleki
geboren am 22. 05. 1973 in Nyíregyháza, Ungarn
ledig

Schulbildung

1979 – 1987 Grundschule in Nyíregyháza
1987 – 1991 Stadtgymnasium in Nyíregyháza, Abschluss Abitur

Studium und berufliche Tätigkeit

1991 – 1993 Bessenyei György Hochschule in Nyíregyháza
 Fächer: Biologie Lehramt und Bibliothekswesen
1993 – 1999 Kossuth Lajos Universität in Debrecen, Ungarn
 Fächer: Biologie, Fachrichtung Genetik und Deutsch-Ungarische
 Fachübersetzung in Biologie
26.07.1999 Diplom
 Titel der Diplomarbeit: Cytologische und genetische Analyse einer
 Zellzyklus-Mutante in der Spaltenhefe *Schizosaccharomyces*
 pombe
seit Sept. 1999 Promotion an der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof.
 Dr. M. Bölker
 Titel der Dissertation: Identifizierung von Cytokinesemutanten in
 Ustilago maydis und molekularbiologische Charakterisierung des
 cla4-Gens

Stipendien und Kurse

1996 Sommer-Forschungsstipendium der Universität Debrecen, Debrecen, Ungarn
1998 Deutscher Sprachkurs in Szeged, Ungarn
 Stiftung Aktion Österreich-Ungarn
1998 Sommer-Forschungsstipendium der Universität Debrecen, Debrecen, Ungarn
1999 Stipendium von "British Society for Cell Biology and the Journal of Cell Science, England"
2000 EMBO Kurs: "GFP and Advanced Microscopy in Cell Biology", MPI für biophysikalische
 Chemie, Göttingen
2002 EMBO Kurs: "Electron Microscopy, Immunocytochemistry and Sterology in Cell Biology",
 EMBL, Heidelberg

Konferenzen und Publikationen

1999 Nationale Konferenz der Studenten, Debrecen, Ungarn
 Vortrag: Cytological and genetic analysis of a cell cycle mutant in fission yeast
 Schizosaccharomyces pombe
2001 Molekularbiologie der Pilze, Jena
 Vortrag: Genetic analysis of morphological mutants in *Ustilago maydis*
2002 6th European Conference on Fungal Genetics, Pisa, Italien
 Vortrag: Role of Cdc42 for cytokinesis and morphology in *Ustilago maydis*

M. Sipiczki, I. Miklos, L. Leveleki, Zs. Antunovics (2000) Genetic and Chromosomal Stability of Wine Yeasts, Methods in Biotechnology, Vol. 14: Food Microbiology Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey

L. Leveleki, M. Bölker (2002) Ein Lösbarer Mutter-Tochter-Konflikt, Bioforum, 25. Jahrgang, Apr 2002, p.241-243

G. Weinzierl, L. Leveleki, A. Hassel, G. Kost, G. Wanner, M. Bölker (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*, Molecular Microbiology (2002) 45(1), 219-231